

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Efectos de la administración intraoperatoria de esmolol sobre la respuesta inflamatoria perioperatoria en un modelo experimental de cirugía de resección pulmonar

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alberto Fernández Peña

DIRECTORES

Elena Vara Ameigeiras
Carlos Simón Adiego
Ignacio Garutti Martínez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

***EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAOPERATORIA
DE ESMOLOL SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA
PERIOPERATORIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
CIRUGÍA DE RESECCIÓN PULMONAR***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alberto Fernández Peña

DIRECTORES

Elena Vara Ameigeiras
Carlos Simón Adiego
Ignacio Garutti Martínez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



***EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAOPERATORIA DE
ESMOLOL SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA
PERIOPERATORIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE CIRUGÍA
DE RESECCIÓN PULMONAR***

Programa de Doctorado de Investigación Biomédica

Alberto Fernández Peña

Bajo la dirección de los doctores:

Elena Vara Ameigeiras

Carlos Simón Adiego

Ignacio Garutti Martínez

Madrid, 2023

*La ligera paloma, en su libre vuelo,
al cortar el aire la resistencia del cual siente,
podría imaginarse poder volar todavía mejor en el vacío.*

Immanuel Kant, Crítica de la Razón Pura

Mi más sincero agradecimiento a:

Los doctores Elena Vara Ameigeiras, Carlos Simón Adiego e Ignacio Garutti Martínez, por su infatigable afán investigador, su continuo trabajo y su infinita paciencia, que han sido los motores que han impulsado en todo momento este proyecto.

El personal de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y del Laboratorio de Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid sin cuya inestimable colaboración no hubiera sido posible este trabajo.

Julia Moreno Jiménez, la persona que más me ha ayudado en este proyecto y con la que comparto los proyectos más importantes de mi vida. Los fáciles se pueden compartir con cualquiera, pero los difíciles solo los emprendería contigo.

Julia y Rodrigo, las personas que menos me han ayudado en este proyecto, pero que hacen que todo lo demás merezca la pena.

Silvia Ramos Cerro, por acompañarme en esta andanza desde el principio y hasta el final, y ser el espejo en que me miro para buscar la excelencia.

Mayte y Vicente, que han hecho posible esto y todo lo demás.

Diana y Alicia, porque nos lo decimos poco, pero es verdad.

Julia, Fernando y Aurora, por ayudarme a conseguir el tiempo que tanto necesitaba.

Índice

Lista de Abreviaturas y Acrónimos	4
Resumen	7
Summary	11
Introducción	15
1. Respuesta inflamatoria	17
1.1 Generalidades	17
1.2 La cascada inflamatoria.....	20
2. Respuesta inflamatoria en cirugía de resección pulmonar.....	22
2.1 Generalidades	22
2.2 Importancia Clínica en Cirugía.....	23
2.3 Importancia Clínica en Cirugía de Resección Pulmonar	25
2.4 Respuesta inflamatoria por Ventilación Unipulmonar.....	27
2.5 Marcadores inflamatorios.....	32
2.6 Óxido nítrico y óxido nítrico sintetasas.....	34
3. El Glicocáliz.....	35
3.1 Syndecan	38
4. Apoptosis.....	38
4.1 La familia BCL-2	39
4.2 Catepsinas	41
5. El papel del hígado	41
6. Sistema Nervioso Simpático.....	44
6.1 Generalidades	44
6.2 SNS e Inflamación.....	45
6.3 Hígado y Sistema Nervioso Simpático.....	48
6.4 Sistema Nervioso Parasimpático e Inflamación	50
7. Betabloqueantes y Esmolol.....	50
7.1 Esmolol	52

Hipótesis y Objetivos 59

Hipótesis..... 61
Objetivo principal..... 61
Objetivos secundarios 61

Material y Métodos 63

1. Sujetos Experimentales 66
2. Procedimiento anestésico 67
3. Procedimiento quirúrgico 72
4. Recogida de datos y obtención de muestras. 73
 4.1 Gasometrías arteriales. 73
 4.2 Parámetros hemodinámicos y respiratorios. 74
 4.3 Muestras de suero..... 74
 4.4 Biopsias hepáticas. 74
5. Análisis bioquímico:..... 75
6. Estudio estadístico: 78

Resultados..... 81

1. Parámetros Hemodinámicos y Gasométricos 83
2. Biomarcadores en Suero 90
 TNF α 90
 IL-1 92
 Syndecan 94
 NO..... 95
 Catepsina 96
3. Biomarcadores en Biopsias hepáticas 97
 TNF α 97
 IL-1 98
 IL-10..... 99
 NF- κ B 100
 MCP-1 101

eNOS.....	102
iNOS.....	103
Syndecan	104
Bcl-2.....	105
BAX	106
PUMA	107
BAD.....	108
BAK	109

Discusión 111

1. Efecto hemodinámico	113
2. Efecto respiratorio.....	115
3. Respuesta inflamatoria sistémica	117
4. Daño Endotelial	120
5. Respuesta inflamatoria hepática.....	122
6. Apoptosis.....	125

Conclusiones..... 127

Bibliografía 131

Lista de Abreviaturas y Acrónimos

ACTH: Adrenocorticotropic Hormone, Hormona Adrenocorticotrópica

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas

eNOS: Endothelial Nitric Oxide Synthase, Sintetasa Endotelial del Óxido Nítrico

FEV1: Forced Expiratory Volume 1st second, Volumen Espiratorio Forzado en el primer Segundo

FiO2: Fracción de Oxígeno inspirado

GC: Gasto Cardíaco

GEDI: Global End Diastolic Index, Índice de Volumen Global al Final de la Diástole

IC: Índice Cardíaco

IL: Interleuquina

iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase, Sintetasa Inducible del Óxido Nítrico

MCP: Monocyte Chemoattractant Protein, Proteína Quimiotáctica de Monocitos

nNOS: Neuronal Nitric Oxide Synthase, Sintetasa Neuronal del Óxido Nítrico

OCFA: Obstrucción Crónica del Flujo Aéreo

PA: Presión arterial

PAM: Presión Arterial Media

PAMP / DAMP: Pathogen/Damage Associated Molecular Patterns, Patrones Moleculares Asociados a Patógenos/Daño

PEEP: Positive End Expiration Pressure, Presión Positiva al Final de la Espiración

PPaw: Presión Pico en la Vía Aérea

PRR: Pattern Recognition Receptors

PVC: Presión Venosa Central

RNS: Reactive Nitrogen Species, Especies Reactivas de Nitrógeno

ROS: Reactive Oxygen Species, Especies Reactivas de Oxígeno

RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Parasimpático

SNS: Sistema Nervioso Simpático

SpO2: Saturación Periférica de Oxígeno

TNF: Tumor Necrosis Factor, Factor de Necrosis Tumoral

TDTP: Termodilución Transpulmonar

VATS: Video Assisted Thoracic Surgery, Cirugía Torácica Video-Asistida

VBP: Ventilación Bipulmonar

VM: Volumen Minuto

VUP: Ventilación Unipulmonar

VVS: Variación de Volumen Sistólico

Resumen

Introducción: Durante la cirugía de resección pulmonar se produce una respuesta fisiológica inflamatoria debido por un lado a la agresión quirúrgica y por otro al daño pulmonar que se puede producir durante la ventilación unipulmonar. Esta inflamación es crucial, ya que existe una importante relación entre la intensidad de la respuesta inflamatoria durante la cirugía y la frecuencia y gravedad de las complicaciones postoperatorias.

La activación del sistema nervioso simpático perioperatoria tiene la capacidad de alterar la respuesta inflamatoria intra y postoperatoria. La activación de los receptores beta-adrenérgicos aumenta la expresión de mediadores pro y antiinflamatorios, y el bloqueo de dichos receptores puede atenuar esta respuesta. Las citoquinas producidas en el daño pulmonar agudo tienen un papel fundamental en el inicio y la propagación de la respuesta inflamatoria, produciendo una respuesta inflamatoria sistémica, apoptosis y daño al glicocáliz.

El Esmolol es un fármaco que bloquea selectivamente los receptores β -1 adrenérgicos. Se ha demostrado que disminuye el daño de isquemia-reperfusión, el estrés oxidativo y la expresión de citoquinas proinflamatorias. Además, diferentes investigaciones han comprobado su potencial como protector endotelial. Todos estos efectos, no relacionados con su capacidad para modular la respuesta hemodinámica, podrían ser útiles para atenuar la respuesta inflamatoria en la cirugía de resección pulmonar con periodos de ventilación unipulmonar, donde intervienen los mecanismos antes citados.

Hipótesis: El antagonismo farmacológico de los receptores beta-adrenérgicos, mediante la administración perioperatoria de una perfusión continua de esmolol, podría atenuar la respuesta inflamatoria asociada al estrés que conlleva la cirugía de resección del parénquima pulmonar con periodo de ventilación unipulmonar en un modelo experimental porcino.

Objetivo Principal: Analizar el efecto de una perfusión continua perioperatoria de esmolol intravenoso sobre la respuesta inflamatoria sistémica en el intra y perioperatorio de un modelo experimental de cirugía de resección pulmonar.

Material y Métodos: Veinticuatro cerdos de la raza Large White son divididos en tres grupos de ocho animales. El grupo Control y el grupo Esmolol son sometidos a una cirugía de resección pulmonar con ventilación unipulmonar bajo anestesia general. Al grupo Esmolol le es administrada una perfusión de esmolol durante la intervención. El grupo Sham es sometido a una toracotomía bajo anestesia general, sin realizarse resección pulmonar o ventilación unipulmonar. Durante el procedimiento se monitorizan parámetros hemodinámicos y se obtienen muestras de sangre. 24 horas después se obtienen biopsias hepáticas bajo anestesia general.

En suero se analizan TNF α , IL-1, Syndecan, NO y catepsina. En biopsias hepáticas se analizan TNF α , IL-1, IL-10, NF- κ B, MCP-1, eNOS, iNOS, Syndecan, Bcl-2, BAX, PUMA, BAD y BAK. Se utilizó Western Blotting para medir la expresión de TNF α , IL-1, Syndecan y catepsina en suero; así como de TNF α , IL-1, IL-10, Nf-KB, MCP1, eNOS, iNOS, Bcl-2, BAX, PUMA, BAD, BAK y Syndecan en biopsias hepáticas. Se utilizó ELISA para medir en suero niveles de TNF α e IL-1. Se utilizó RT-PCR para medir los niveles de ARN mensajero de TNF α , IL-1, IL-10, NF- κ B, MCP1, eNOS e iNOS en biopsias hepáticas.

Resultados: No se observaron diferencias significativas entre los grupos en los parámetros hemodinámicos más importantes, incluyendo PAM, FC, e IC. Similarmente, no se hallaron diferencias entre el grupo Control y Esmolol en los parámetros gasométricos y respiratorios, incluyendo PaO₂, PaCO₂, pH y PPaw.

En suero se objetivan aumentos de TNF α , IL-1 y Syndecan en el grupo Control respecto al Sham, que resultan disminuidos mediante el tratamiento con esmolol. NO disminuye con la

cirugía de resección pulmonar pero el esmolol aminora esta reducción. No hay diferencias en cuanto a catepsina.

En biopsias hepáticas se observó que el esmolol produce un descenso significativo de las citoquinas proinflamatorias TNF α , IL-1 y MCP-1, así como de NF- κ B con respecto al grupo Control; mientras que aumenta los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10.

El tratamiento con esmolol produce aumento de los niveles de eNOS en biopsias hepáticas con respecto al Control, mientras que reduce los niveles de iNOS y Syndecan.

Se produce con esmolol un descenso en BAX, BAD y BAK con respecto al grupo Control, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre estos grupos en Bcl-2 y PUMA en las biopsias hepáticas.

Conclusiones: La ventilación unipulmonar y la cirugía de resección pulmonar produce una respuesta inflamatoria hepática y sistémica, así como una alteración en la función endotelial, en la integridad del glicocálix y una respuesta apoptótica en el parénquima hepático.

El tratamiento con esmolol reduce la respuesta inflamatoria hepática y sistémica producida por la ventilación unipulmonar y resección pulmonar.

El tratamiento con esmolol atenúa la alteración en la función endotelial y el daño al glicocálix producido en la cirugía de resección pulmonar.

El tratamiento con esmolol atenúa parcialmente la respuesta apoptótica hepática producida en esa cirugía.

La perfusión de esmolol a las dosis estudiadas no produce cambios significativos desde el punto de vista hemodinámico y respiratorio en animales sanos.

Summary

Introduction: A physiological inflammatory response is produced during lung resection surgery, partly due to surgical aggression and partly due to pulmonary injury produced during one lung ventilation. This inflammation is crucial, considering the notable relationship between the intensity of the inflammatory response during surgery and postoperative complication frequency and severity.

Perioperative activation of the sympathetic nervous system has the capacity to alter intra and postoperative inflammatory response. Activation of beta-adrenergic receptors increases the expression of pro and anti-inflammatory mediators and blocking these receptors can attenuate this response. Cytokines produced during acute pulmonary damage play a fundamental role in the initiation and propagation of the inflammatory response, producing a systemic inflammatory response, apoptosis and damaging the glycocalyx.

Esmolol is a drug that selectively blocks β -1 adrenergic receptors. It has been proven to diminish ischemia-reperfusion damage, oxidative stress and proinflammatory cytokine expression. Additionally, different investigations have proven its potential as an endothelial protector. These effects, unrelated with its capacity to modulate hemodynamic response, could be useful in attenuating the inflammatory response in lung resection surgery with periods of one lung ventilation, where the previously cited mechanisms intervene.

Hypothesis: Pharmacologic antagonism of beta-adrenergic receptors, through perioperative administration of a continuous perfusion of esmolol, could attenuate the stress-associated inflammatory response elucidated by lung resection surgery with a period of one lung ventilation in a porcine experimental model.

Primary Objective: To analyze the effect of a continuous perioperative intravenous perfusion of esmolol on intra and perioperative systemic inflammation in an experimental lung resection model.

Material and Methods: Twenty-four Large White pigs are divided in three groups, with eight animals each. Control and Esmolol groups are subjected to pulmonary resection surgery with one lung ventilation under general anesthesia. An esmolol perfusion is administered to Esmolol group during the procedure. Sham group is subjected to thoracotomy under general anesthesia, without performing pulmonary resection or one lung ventilation. Hemodynamic parameters are recorded during the procedure and blood samples are extracted. 24 hours later, hepatic biopsies are obtained under general anesthesia.

Serum levels of TNF α , IL-1, Syndecan, NO and cathepsin are determined. TNF α , IL-1, IL-10, NF- κ B, MCP-1, eNOS, iNOS, Syndecan, Bcl-2, BAX, PUMA, BAD and BAK are analyzed in liver biopsies. Western blotting was used to determine serum expression of TNF α , IL-1, Syndecan and cathepsin; as well as TNF α , IL-1, IL-10, NF- κ B, MCP1, eNOS, iNOS, Bcl-2, BAX, PUMA, BAD, BAK and Syndecan in liver biopsies. ELISA was used to measure serum levels of TNF α and IL-1. RT-PCR was used to measure ARNm levels of TNF α , IL-1, IL-10, NF- κ B, MCP1, eNOS and iNOS in liver biopsies.

Results: No statistically significant differences were observed between the groups in the most important hemodynamic parameters, including MAP, HR and CI. Conversely, no differences in gasometric and respiratory parameters were found between Control and Esmolol groups, including PaO₂, PaCO₂, pH and PPaw.

Rises in TNF α , IL-1 and Syndecan were observed in Control group in comparison with Sham, which were diminished with esmolol treatment. NO decreases with pulmonary

resection surgery but esmolol lessens this reduction. No differences were found regarding cathepsin.

In liver biopsies esmolol produced a significant reduction in proinflammatory cytokines TNF α , IL-1 and MCP-1, as well as NF- κ B, when compared to Control group; while increasing levels of anti-inflammatory cytokine IL-10.

Treatment with esmolol causes an increase in eNOS y liver biopsies relative to Control group, while reducing iNOS and Syndecan levels.

With esmolol, a reduction in BAX, BAD and BAK is observed in comparison to Control group, but no statistically significant differences were observed between these groups regarding Bcl-2 and PUMA in liver biopsies.

Conclusions: One lung ventilation and pulmonary resection surgery produces an hepatic and systemic inflammatory response, as well as alterations in endothelial function, in glycocalyx integrity and an apoptotic response in hepatic parenchyma.

Treatment with esmolol reduces hepatic and systemic inflammatory response produced by one lung ventilation and pulmonary resection.

Treatment with esmolol attenuates the alteration in endothelial function and damage to the glycocalyx produced in lung resection surgery.

Treatment with esmolol partially attenuates the hepatic apoptotic response produced in this surgery.

An esmolol infusion at the studied doses does not produce significant changes form the hemodynamic and respiratory point of view in healthy animals.

Introducción

1. Respuesta inflamatoria

1.1 Generalidades

La respuesta inflamatoria o respuesta al estrés es una reacción fisiológica al daño orgánico, desarrollada para maximizar el potencial de curación del organismo. Sus signos y síntomas clásicos fueron descritos por Aulo Cornelio Celso en el siglo primero como calor, tumor, rubor y dolor, a lo que posteriormente se sumó pérdida de función del órgano afectado. Inicialmente se consideraba un proceso únicamente deletéreo y localizado en un punto concreto del cuerpo, como podemos deducir de los síntomas citados.

Desde la antigüedad se han buscado formas de combatir la inflamación, aun cuando sus mecanismos no habían sido esclarecidos. Quizá la instancia más conocida de esto es la utilización por parte de Hipócrates y los antiguos griegos el extracto de la corteza de sauce (o *salix*) para tratar la fiebre y el dolor. Esto acabaría culminando en la síntesis del ácido acético salicílico en el siglo XIX y su posterior comercialización como Aspirina, que se convertiría en uno de los fármacos más utilizados de la historia.¹

Esta lucha constante contra la inflamación, tan antigua como la propia práctica de la medicina, no es casual, ya que la inflamación forma parte fundamental de la patogénesis de una plétora de enfermedades diferentes. A nivel cardiovascular la inflamación es parte fundamental de la aterosclerosis y la ruptura de las placas de ateroma, contribuyendo por lo tanto al infarto de miocardio y al ictus, dos de las principales causas de mortalidad a nivel mundial.² Similarmente, la relación entre la inflamación y la diabetes de tipo 2, otra de las patologías más importantes en nuestro medio está cada vez más clara.³ No podemos olvidar las patologías pulmonares, siendo un factor clave en el desarrollo de asma u OCFA (Obstrucción Crónica del Flujo Aéreo).⁴

Esas son sólo algunas de las patologías más relevantes en las que la inflamación juega un papel importante, pero la lista completa de estas patologías es inabarcable y afecta a prácticamente todos los órganos y sistemas del cuerpo humano, desde las enfermedades inflamatorias intestinales, pasando por la pancreatitis y su relación directa con el letal cáncer de páncreas, hasta la enfermedad de Alzheimer en el cerebro o las enfermedades hepáticas crónicas.⁵

A pesar de lo anterior, hoy en día sabemos que es un mecanismo de supervivencia común a todos los animales vertebrados sin el cual sería imposible la curación de la mayoría de heridas e infecciones, convirtiéndose en patológico únicamente cuando la respuesta inflamatoria es insuficiente o excesiva. Es además un proceso sistémico, no meramente local, constando de diferentes componentes, tanto inmunológicos, como hematológicos, hemodinámicos y endocrinos.

Desde el punto de vista endocrinológico, se produce la activación hipotalámica del sistema nervioso simpático y la liberación hipofisaria de hormonas entre las que destacan la hormona adrenocorticotrópica (ACTH por sus siglas en inglés) y hormona de crecimiento humana. La ACTH condiciona a su vez liberación de cortisol. Esto produce una disminución en la secreción de insulina, así como una disminución de sus efectos a nivel periférico, denominado resistencia a la insulina. Se produce también un descenso en la producción de hormona tiroidea, así como un aumento en la producción de glucagón. La respuesta endocrina al estrés es por lo tanto una respuesta catabólica, que permite a otros tejidos efectores de la respuesta inflamatoria tener los recursos adecuados para desempeñar su función, como por ejemplo la glucosa necesaria para el metabolismo de los leucocitos o los aminoácidos que sirven de sustrato al hígado para la síntesis proteica.

A nivel cardiopulmonar, se produce concomitantemente vasodilatación e incremento del gasto cardiaco, permitiendo movilizar los recursos mencionados anteriormente, así como un

incremento en la ventilación para proporcionar el oxígeno necesario y eliminar el dióxido de carbono producido por este estado hipermetabólico.

Atendiendo a los vasos sanguíneos, observamos un aumento de la permeabilidad vascular, producido en parte por la separación de las uniones estrechas capilares, permitiendo el paso de fluido y sustratos, así como de leucocitos, inicialmente neutrófilos y macrófagos, a las zonas lesionadas. Esto facilita la llegada de estos elementos a zonas peor vascularizadas, o bien que hayan podido ver comprometida su vascularización por el mecanismo lesional.⁶

Estos mecanismos son beneficiosos para la recuperación generalmente, pero si no son adecuadamente regulados tienen potencial para resultar muy deletéreos. Un aumento excesivo o demasiado mantenido en el tiempo de la permeabilidad vascular provocará excesiva extravasación de líquido y edema. Si el estado de hipercatabolismo se mantiene en el tiempo se producirá un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, llamado sepsis si el agente causal es infeccioso. Estas complicaciones suponen un aumento significativo de la morbilidad y mortalidad de los pacientes, suponiendo una de las causas más importantes de muerte en el mundo.⁷

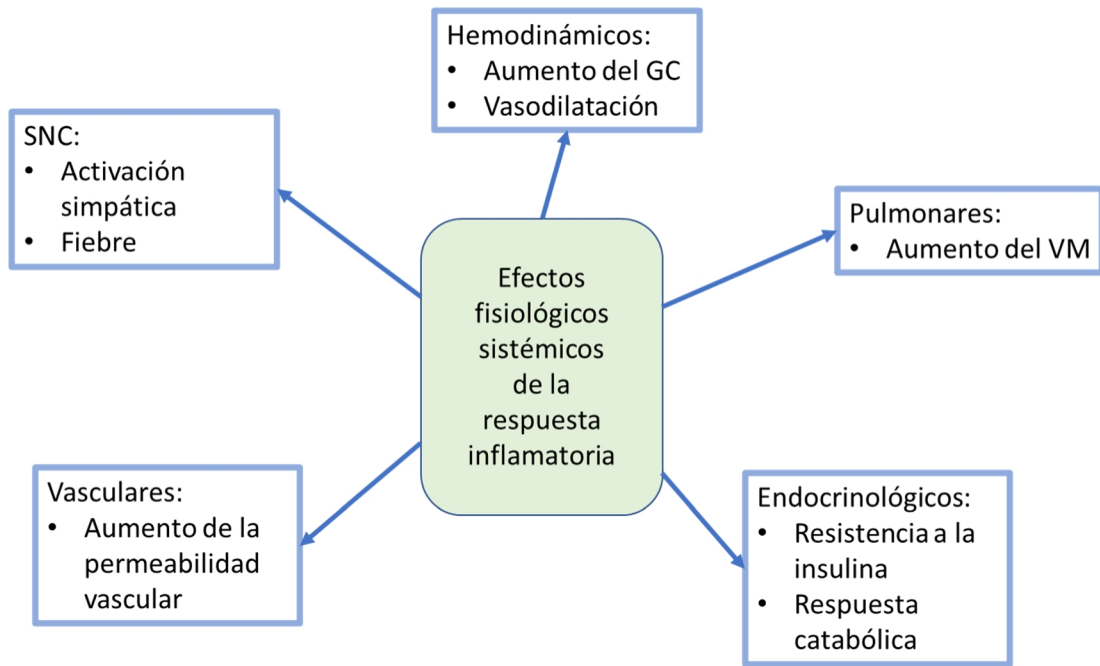


Fig 1: Efectos sistémicos de la respuesta inflamatoria. SNC: Sistema Nervioso Central. GC: Gasto cardiaco. VM:

Volumen minuto.

1.2 La cascada inflamatoria

La inflamación puede estar causada por una plétora de factores etiológicos diferentes.

Pueden ser:

- Infecciosos: bacterias, virus y otros microorganismos.
- Físicos: quemaduras, radiación ionizante, frío o calor intensos, traumatismos.
- Químicos: toxinas, irritantes químicos u otras sustancias nocivas.
- Biológicos: células dañadas o restos celulares.

Receptores en la superficie de las membranas celulares, llamados genéricamente PRR (Pattern Recognition Receptors) reconocen patrones moleculares asociados a patógenos o al daño (PAMP y DAMP respectivamente, por sus siglas en inglés). Estos receptores se expresan tanto en células inmunes como no inmunes. Son receptores de diferentes tipos, siendo los más estudiados los Toll-like receptors, pero también existen otro como los receptores de lectina de tipo C, receptores similares al gen inducible por ácido retinóico, y receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos.⁸

Estos receptores activan vías de señalización celular, principalmente las vías mediadas por NF- κ B, MAPK, y JAK-STAT, que activan la transcripción de citoquinas proinflamatorias principalmente en macrófagos y mastocitos, siendo las más importantes de estas citoquinas TNF α , IL-1 e IL-6, iniciando la cascada inflamatoria.⁵

La IL-1 y el TNF α inducen a las células endoteliales a expresar moléculas que actúan como ligandos de las integrinas leucocitarias, favoreciendo la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular. También inducen la secreción de quimiocinas, permitiendo el reclutamiento y migración de leucocitos al lugar de la inflamación.

Los macrófagos y neutrófilos activados que llegan a los tejidos generan una serie de moléculas con el objetivo de eliminar microorganismos u otros elementos dañinos que fagocitan. Generan especies reactivas de oxígeno (ROS), sustancias muy oxidantes y reactivas que destruyen microorganismos y otras células; especies reactivas del nitrógeno (RNS), como óxido nítrico, producidas por la enzima Óxido Nítrico Sintetasa Inducible (iNOS); y enzimas proteolíticas, como elastasa o catepsina G. Todas estas moléculas son también muy tóxicas para las células y la matriz extracelular del huésped, por lo que pueden producir un daño tisular importante.⁹

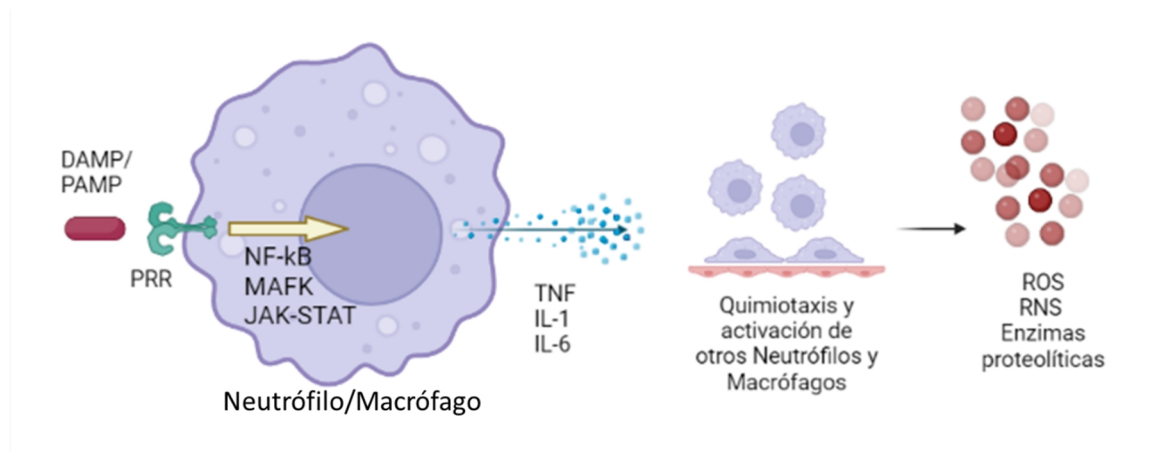


Fig 2: Inicio de la cascada inflamatoria. DAMP/PAMP: Damage/Pathogen Associated Molecular Pattern. PPR: Pattern Recognition Receptors. ROS/RNS: Reactive Oxigen/Nitrogen Species.

2. Respuesta inflamatoria en cirugía de resección pulmonar

2.1 Generalidades

El trauma quirúrgico desencadena una amplia respuesta inflamatoria sistémica mediada por factores hormonales, inmunes y metabólicos. La reacción inflamatoria se inicia, como hemos visto anteriormente, por la liberación de DAMPs, que se produce en el contexto quirúrgico se pueden producir por una amplia variedad de mecanismos. El más evidente es el daño directo producido a las células por la propia agresión quirúrgica, al realizar las incisiones necesarias, reseca tejidos, etc. Otro mecanismo es la hipoperfusión, al resecarse o comprimirse vasos sanguíneos, o por la hipotensión o pérdida sanguínea que puede ocasionar la cirugía, impidiendo que los tejidos reciban el aporte sanguíneo que necesitan para su mantenimiento metabólico. Muy ligado a lo anterior se encuentra la lesión por isquemia-reperfusión, combinando la mentada lesión por hipoperfusión con la subsiguiente recuperación del aporte sanguíneo y con ello la formación de ROS y el paso de mediadores de isquemia a la circulación general. También la transfusión de sangre, frecuente tratamiento ante el sangrado quirúrgico

está fuertemente relacionado con la inflamación perioperatoria. Por último, tenemos que considerar la ventilación mecánica como mecanismo inflamatorio importante como describiremos en detalle más adelante.¹⁰

Los mecanismos antes citados van a producir la liberación de DAMPs que inician la cascada inflamatoria como hemos descrito, o incluso pueden producir directamente la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de las células implicadas. En cualquier caso, se producirá leucocitosis en sangre, con migración de monocitos y aumento de su capacidad fagocítica en los tejidos dañados. En estos tejidos se produce una subsiguiente liberación de citoquinas mediada por monocitos en la zona de la lesión, incluyendo TNF α , IL-1, IL-6 e IL-8, retroalimentando y perpetuando así la reacción inflamatoria.¹¹

2.2 Importancia Clínica en Cirugía

Según un estudio analizando los datos de 2005, se realizan aproximadamente 234 millones de procedimientos de cirugía mayor al año en el mundo. De ellos, alrededor de 1,3 millones de pacientes sufren complicaciones postoperatorias, y 315.000 pacientes fallecen durante su estancia hospitalaria.¹² Un estudio posterior analizando las cifras de 2012 revela un total estimado de 312 millones de cirugías mayores al año.¹³ Teniendo en cuenta el incremento de la población y la tendencia global, esos elevados números probablemente hayan seguido en aumento durante los últimos años y sigan aumentando en el futuro. La morbilidad perioperatoria es por lo tanto un problema con importancia global que previsiblemente seguirá en aumento en los próximos años, y cualquier reducción de la mortalidad puede contribuir a evitar miles de muertes anualmente.

Desde hace décadas conocemos la relación entre cirugía e inflamación, sabiendo que la agresión quirúrgica produce en los pacientes una respuesta inflamatoria que podemos cuantificar de forma objetiva, midiendo la producción de citoquinas inflamatorias.¹⁴ Esto da lugar a la realización de múltiples estudios posteriores relacionando la respuesta inflamatoria

con complicaciones postoperatorias, llevándonos a la conclusión de que la respuesta inflamatoria perioperatoria es una parte fundamental de muchas de las complicaciones postoperatorias más importantes, y por lo tanto condiciona enormemente la morbilidad y mortalidad quirúrgica.

Las infecciones en el medio quirúrgico se encuentran entre las complicaciones más importantes, siendo culpables de incrementos en la mortalidad perioperatoria, así como estancia hospitalaria aumentada y aumento de costes totales.¹⁵ La respuesta inflamatoria perioperatoria exacerbada, manifestada como un aumento de la citoquina proinflamatoria IL-6, ha demostrado relación con el desarrollo de sepsis postoperatoria.¹⁶ Dentro de la propia cirugía de resección pulmonar se han constatado estos hallazgos, habiéndose relacionado la respuesta inflamatoria en el periodo intraoperatorio con la aparición de complicaciones infecciosas.¹⁷

Las complicaciones respiratorias tienen una importancia cardinal en la cirugía torácica, siendo una causa fundamental de morbilidad y mortalidad, con una incidencia muy significativa, en torno al 16% según un estudio reciente.¹⁸ También este tipo de complicaciones se han relacionado con la respuesta inflamatoria perioperatoria.¹⁷

El delirio y la disfunción cognitiva postoperatoria son otras de las complicaciones postquirúrgicas más importantes, afectando según algunos estudios en torno a un 15% de los pacientes quirúrgicos por encima de 60 años, mientras que otros lo cifran hasta en un 40%.¹⁹ Este grupo demográfico es tremendamente prevalente en nuestro medio y está en continuo aumento. La aparición de esta complicación ha demostrado estar íntimamente ligada a la respuesta inflamatoria sistémica, que a su vez produce la neuro-inflamación culpable de este efecto adverso, que resulta a su vez en un aumento de tiempo de hospitalización e incluso de mortalidad. También puede persistir el deterioro cognitivo semanas tras la cirugía.^{20 21}

Ante la importancia clínica de la respuesta inflamatoria perioperatoria, han ganado cada vez mayor importancia diferentes intervenciones que se pueden realizar para minimizar esta respuesta. El éxito de estas medidas tanto para reducir la inflamación como para especularmente reducir las complicaciones perioperatorias pone de manifiesto una vez más la trascendencia de esta respuesta inflamatoria perioperatoria.

Un ejemplo evidente de esto es la cirugía laparoscópica, una forma de cirugía menos invasiva que pretende reducir la intensidad del trauma quirúrgico. La cirugía laparoscópica ha demostrado producir una elevación menor de citoquinas proinflamatorias en sangre en comparación con la cirugía abierta, y en consecuencia se asocia a una menor tasa de complicaciones durante el periodo postoperatorio.^{22 23}

2.3 Importancia Clínica en Cirugía de Resección Pulmonar

La cirugía torácica representa un importante desafío, tanto desde el punto de vista de las complicaciones como de la respuesta inflamatoria perioperatoria. La cirugía de resección pulmonar se considera un procedimiento de riesgo intermedio-alto, con una tasa de mortalidad intrahospitalaria en torno al 2% en el caso de las lobectomías y llegando al 6% en las neumonectomías.²⁴ Ante esa mortalidad tan significativa quizá no sea de extrañar que esta cirugía conlleve también una tasa de inflamación superior a otras cirugías de similar complejidad. En comparación con la cirugía colorrectal y otras cirugías abdominales menos agresivas, la cirugía torácica no cardíaca, como la cirugía de resección pulmonar o la esofagectomía, produce una mayor respuesta inflamatoria sistémica, con mayores niveles de IL-6 e IL-8 cuantificados en sangre. Estos datos están corregidos por duración de la cirugía y pérdida sanguínea, por lo que debe existir una causa intrínseca a la propia cirugía que justifique esta inflamación. Por una parte, puede ser debido al gran lecho vascular del tejido pulmonar que incluye células responsables de esta respuesta inmune, y por otra la necesidad de realizar ventilación unipulmonar (VUP).²⁵

Por esta razón surgen también dentro de la cirugía torácica diferentes técnicas que disminuyen la respuesta inflamatoria causada por la cirugía. La cirugía torácica video-asistida (VATS) es una de las que tiene un mayor impacto. Esta forma de cirugía mínimamente invasiva pretende disminuir al máximo el daño a los tejidos del paciente, limitando con ello la inflamación producida. De esta forma, ha demostrado una menor liberación de citoquinas inflamatorias con respecto a la cirugía convencional o abierta.²⁶ Esto repercute directamente en los resultados clínicos de los pacientes, habiendo demostrado este método una menor morbilidad.²⁷

El papel del anestésista es también crucial a la hora de reducir la inflamación y por lo tanto mejorar los resultados clínicos. El propio paradigma de la anestesia ha ido cambiando desde sus orígenes. En un principio su único objetivo era reducir el dolor asociado a las cirugías, pero pronto evolucionó a proporcionar un manejo del paciente que redujese la mortalidad. A día de hoy, ya no basta con esos objetivos tan “sencillos” sino que se busca mantener la homeostasis del paciente lo más intacta posible, con la intención de que la cirugía tenga el mínimo efecto posible y que el paciente recupere el estado que tenía previo a la agresión quirúrgica de la forma más eficaz y rápida posible.²⁸

Con esto en mente, y teniendo en cuenta el potencial inflamatorio de la cirugía de tórax, se han buscado medidas para reducir la inflamación en estas intervenciones. Una de las más trascendentales es la ventilación protectora, que discutiremos en mayor detalle más adelante, pero también tienen gran relevancia las medidas farmacológicas.

Estas medidas pasan en primer lugar por estudiar cuales son los fármacos anestésicos que tienen un mejor perfil antiinflamatorio entre los que disponemos, siendo por ejemplo en el caso de esta cirugía el sevoflurano superior al propofol.²⁹ También se han buscado otros fármacos que puedan ser administrados como coadyuvantes para disminuir la inflamación en esta cirugía, con el objetivo mencionado de mantener al máximo la homeostasis del paciente, mejorando los

resultados de la cirugía. Un ejemplo de lo anterior es la lidocaína, que en perfusión continua ha demostrado disminuir los mediadores inflamatorios en este tipo de intervención.³⁰

2.4 Respuesta inflamatoria por Ventilación Unipulmonar.

Uno de los factores más importantes que influye en la respuesta inflamatoria en este tipo de cirugías, como hemos mencionado, es la ventilación mecánica. La ventilación mecánica es una herramienta fundamental en el soporte vital avanzado y en toda cirugía que conlleve anestesia general y relajación muscular, aunque desde sus orígenes se conoce que puede tener efectos dañinos sobre el pulmón.³¹ Clásicamente la justificación fisiopatológica que se ha esgrimido siempre para justificar estos daños ha sido fundamentalmente física, en relación a los volúmenes y las presiones utilizadas, pero desde hace años el paradigma ha ido cambiando, dándose una mayor importancia al daño producido por la respuesta inflamatoria producida por los diferentes mediadores liberados como respuesta a la ventilación mecánica, el llamado “biotrauma”.³²

La ventilación mecánica en el caso la cirugía de resección pulmonar tiene la particularidad de que resulta necesario en la mayoría de los casos realizar ventilación unipulmonar. De esta forma se evita ventilar el pulmón a intervenir, facilitando la técnica quirúrgica y reduciendo el sangrado, gracias a la disminución de perfusión que se produce por la ausencia de ventilación, denominada vasoconstricción pulmonar hipóxica.³³ Este tipo de ventilación tiene un efecto perjudicial sobre el pulmón mayor que el de la ventilación mecánica convencional, incrementando el riesgo de sufrir complicaciones pulmonares postoperatorias y produciendo una mayor respuesta inflamatoria.³⁴ Podemos distinguir diferentes mecanismos de lesión pulmonar en el pulmón ventilado y el no ventilado.

Pulmón ventilado

Uno de los mecanismos por los que ocurre el daño pulmonar es la sobredistensión del pulmón ventilado, al recibir un volumen corriente mayor y mayores presiones, comúnmente llamado volutrauma y barotrauma respectivamente al daño producido por estos mecanismos. Es bien conocida la relación entre los volúmenes y presiones elevadas durante la ventilación mecánica y el daño pulmonar desde hace décadas. En el experimento clásico de Webb se ventilaba a ratas con elevadas presiones pico, objetivándose después edema perivascular y alveolar en los pulmones de los animales, que era mitigado con la aplicación de PEEP (Presión positiva al final de la espiración, por sus siglas en inglés), lo cual reducía la *driving pressure*, diferencia entre las presiones pico y PEEP.³⁵ Similarmente, Dreyfuss halló edema pulmonar en animales ventilados con altos volúmenes, pero no así en los ventilados con volúmenes bajos, remarcando la importancia del volutrauma.³⁶ Estos volúmenes y presiones mayores han demostrado en múltiples experimentos estar directamente relacionados con una mayor expresión de citoquinas inflamatorias, con el incremento de morbilidad que ello supone.^{37 38 39}

En el pulmón ventilado también son frecuentes las áreas de atelectasia, por la propia ventilación mecánica, las altas concentraciones de oxígeno que se utilizan provocando atelectasias por reabsorción y la posición quirúrgica en decúbito lateral. Esto se evidencia por el aumento en oxigenación que se obtiene en la mayoría de pacientes con las maniobras de reclutamiento.⁴⁰ Las atelectasias condicionan un aumento en la FiO₂ y la presión ventilatoria para mantener la adecuada oxigenación del paciente. El colapso y apertura cíclica de los alveolos durante la espiración e inspiración también llamado “reclutamiento tidal” es otro mecanismo que causa daño pulmonar.⁴¹

Es frecuente utilizar concentraciones de oxígeno más altas durante la VUP para prevenir la desaturación del paciente, al disponer de menos parénquima pulmonar para el intercambio gaseoso por el colapso del pulmón contralateral. La hiperoxia resultante a la que se somete a

los pulmones durante estos procedimientos también ha demostrado producir un mayor estrés oxidativo y una respuesta inflamatoria aumentada.⁴²

El pulmón ventilado tiene un mayor flujo sanguíneo durante la ventilación unipulmonar. Esto se debe en parte por la vasoconstricción hipóxica del pulmón no ventilado, una respuesta fisiológica a la hipoventilación, y a la posición quirúrgica más habitual, con el pulmón ventilado más bajo que el no ventilado. Este flujo sanguíneo aumentado resulta en un mayor daño a los capilares, relacionándose con la lesión pulmonar, y estando ligado a edema, hemorragia, aumento de resistencias vasculares y descenso en la complianza pulmonar.⁴³ Adicionalmente, la suma de este hiperflujo sanguíneo con el aumento de las presiones de ventilación produce un daño mayor que los dos mecanismos por separado.⁴⁴

Pulmón no ventilado

Durante la VUP, el pulmón no ventilado está colapsado, quedando completamente atelectasiado. La atelectasia pulmonar no ha demostrado, a diferencia de los mecanismos anteriores, producir una mayor liberación de citoquinas. No obstante, en modelos animales se ha observado que la posterior reexpansión del pulmón colapsado sí produce una significativa liberación de mediadores inflamatorios, edema pulmonar y reclutamiento de neutrófilos.⁴⁵

Durante la VUP los pulmones se ven sometidos a fenómenos de isquemia-reperusión, un mecanismo lesional que consiste en la interrupción o reducción brusca del flujo sanguíneo a un tejido, seguido de su posterior recuperación. Ocurre en especial en el pulmón no ventilado a causa principalmente de la vasoconstricción pulmonar hipóxica, que se produce de forma fisiológica al no recibir aporte de oxígeno en los alveolos, por la atelectasia completa de este pulmón. Esta isquemia-reperusión, sumada a la reexpansión pulmonar, también ha demostrado en modelos animales un aumento de $\text{TNF}\alpha$, así como disminución de NO y aumento de la permeabilidad microvascular y edema pulmonar.⁴⁶

La propia manipulación quirúrgica a la que se ve sometido el pulmón no ventilado es otra importante fuente de daño pulmonar. Independientemente del resto de efectos nocivos de la VUP, la manipulación quirúrgica ha demostrado producir un aumento en la expresión de mediadores inflamatorios en el pulmón operado, así como marcadores de apoptosis, de daño al glicocálix y edema pulmonar.⁴⁷

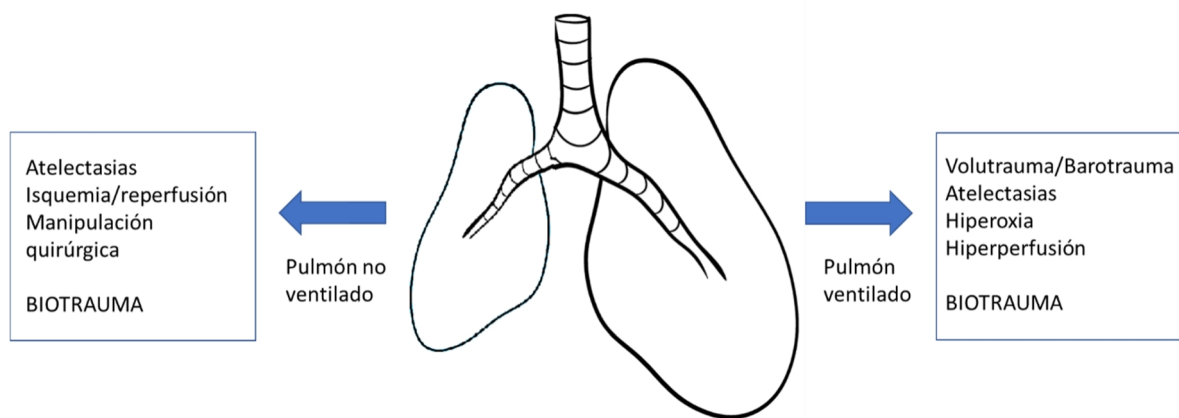


Fig 3: Causas de inflamación pulmonar durante Ventilación Unipulmonar

Biotrauma

Ya mencionamos previamente el concepto de biotrauma, un mecanismo de daño pulmonar que se da en ambos pulmones sometidos a ventilación mecánica. La ventilación mecánica conlleva una liberación de citoquinas por los mecanismos lesionales previamente descritos que causan daño directo a las células o bien activan vías de señalización inflamatorias.²⁰ Entre las citoquinas más importantes que se liberan en los pulmones durante la ventilación mecánica se encuentran $TNF\alpha$, IL-1 e IL-6.⁴⁸ Estos mediadores favorecen la activación y quimiotaxis de leucocitos, que infiltran el parénquima pulmonar, habiéndose demostrado la relación directa entre el atelectrauma producido por la ventilación mecánica y el reclutamiento y activación de neutrófilos en el pulmón.⁴⁹

Otra característica importante de este mecanismo lesional es inactivación del surfactante pulmonar resultante, lo cual favorece la aparición de áreas de atelectasia y reclutamiento tidal,

retroalimentando así el ciclo de daño pulmonar.⁵⁰ Se ha observado también que ocasiona lesión en el glicocálix, produciendo daños en el epitelio pulmonar, que es mayor cuanto mayores son los volúmenes ventilatorios utilizados.³⁴ Este aumento de citoquinas inflamatorias se produce en ambos pulmones, aunque es más pronunciado en el pulmón ventilado, y, crucialmente para la cirugía torácica, es mayor en VUP que en ventilación mecánica convencional.⁵¹ La importancia de este aumento de citoquinas inflamatorias es tremendamente relevante para nuestros pacientes, ya que ha demostrado relación con complicaciones postoperatorias en cirugía de resección pulmonar.¹⁷

Los experimentos citados previamente demuestran que el biotrauma tiene su origen en el pulmón, desencadenándose la liberación de citoquinas proinflamatorias por ventilación mecánica,³⁷⁻³⁹ pero una de las características más notables del biotrauma, y un factor diferenciador con los otros mecanismos de lesión pulmonar es su capacidad para influir la inflamación a nivel sistémico, afectando a órganos distales y a su vez pudiendo ser retroalimentado por la inflamación en otras partes del organismo.⁵²

El parénquima pulmonar se encuentra en una situación única con respecto a otros órganos de cara a la inflamación sistémica, ya que recibe la práctica totalidad del gasto cardiaco y por lo tanto tiene gran capacidad para interactuar con todas las células inflamatorias y citoquinas circulantes. A esto hay que sumar el hecho de que la lesión pulmonar puede producir un incremento de la permeabilidad alveolo-capilar, permitiendo el paso de moléculas desde el alveolo a la circulación sistémica que de otra forma podrían quedar compartimentalizadas dentro del pulmón.⁵³ En esta línea, hay estudios que demuestran que la ventilación mecánica no solo produce mediadores inflamatorios a nivel pulmonar, sino que también pasan a la circulación sistémica, notablemente TNF α , IL-1 e IL-6.^{54 55} También ha demostrado favorecer la activación de neutrófilos y macrófagos circulantes.^{56 57}

Este efecto proinflamatorio a nivel sistémico es una de las principales causas que explican el efecto nocivo que ha demostrado tener la ventilación mecánica sobre otros órganos diana, favoreciendo el fracaso renal,⁵⁸ incrementado la permeabilidad del intestino⁵⁹ y en definitiva siendo un importante factor que puede contribuir a sufrir un fracaso multiorgánico.³⁷

Ventilación protectora

Una de las principales herramientas en nuestro arsenal terapéutico para luchar contra estos mecanismos de daño pulmonar es la ventilación protectora. Ya desde los experimentos de Webb y Dreyfuss explicados previamente se conoce que determinadas formas de ventilación mecánica pueden resultar más nocivas que otras, de lo que se deduce que debe existir una forma óptima de ventilar a los pacientes, minimizando el daño inherente a la ventilación mecánica.^{35 36} Esta estrategia se fundamenta en tres pilares principales. Estos son la aplicación de PEEP, la ventilación con bajo volumen corriente y la realización de maniobras de reclutamiento pulmonar. La aplicación de estas medidas ha demostrado reducir el impacto inflamatorio de la ventilación mecánica, acompañándose de una importante reducción de la morbilidad perioperatoria en cirugía de tórax.^{60 61}

2.5 Marcadores inflamatorios

En la cascada inflamatoria intervienen una plétora de citoquinas y marcadores diferentes tanto pro como antiinflamatorias. Haremos una breve reseña de las utilizadas en el presente estudio.

1) TNF α

Una citoquina producida por una amplia variedad de células, destacando macrófagos y monocitos. Es uno de los mediadores más importantes de la respuesta inflamatoria temprana. Es una proteína soluble que se une a dos receptores distintos, TNFR1 y TNFR2,

desencadenando una cascada proinflamatoria. Entre sus efectos principales está la estimulación de producción y activación de macrófagos, promueve la extravasación de neutrófilos al tejido, aumenta la expresión de moléculas de adhesión endoteliales y favorece la coagulación de la sangre.⁶²

2) IL-1

Los efectos de la IL-1 se superponen considerablemente con los de TNF α . La familia IL-1 está formada por 11 ligandos, 7 de ellos agonistas y cuatro antagonistas, y se relacionan estrechamente con la inmunidad innata. Son sintetizadas por una amplia variedad de células, tanto inmunitarias como no inmunitarias, incluyendo macrófagos, monocitos, neutrófilos, linfocitos B y T, linfocitos NK, células dendríticas, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales y enterocitos. A su vez tiene receptores en diferentes células, mediando numerosos procesos inflamatorios, induciendo la expresión de genes de mediadores proinflamatorios y la expresión de moléculas de adhesión en las células mesenquimatosas y endoteliales, promoviendo la migración de células inmunitarias efectoras a los tejidos. A nivel del SNS media también la fiebre y la producción de cortisol.⁶³

3) IL-10

Una citoquina antiinflamatoria clave en la regulación de la respuesta inflamatoria, contribuyendo a mantener el equilibrio entre una inflamación eficaz y el daño tisular que produce una inflamación excesiva. Inicialmente se describió su producción por linfocitos TH2, aunque ya se ha demostrado su producción por células tanto linfoides como mieloides y también epiteliales. IL-10 inhibe a los macrófagos, reduce la producción de NO y de ROS, así como de citoquinas inflamatorias en neutrófilos y linfocitos T CD4. Aumenta por otra parte la proliferación de linfocitos T CD8, mastocitos y linfocitos B.⁶⁴

4) NFκB

Es una familia de factores de transcripción diméricos con una importante función en la regulación de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. La vía del NFκB ha sido considerada clásicamente como un prototipo de vía proinflamatoria. Tiene, no obstante, efectos complejos, tanto pro como anti-inflamatorios, teniendo respuestas transcripcionales diferentes, específicas para diferentes señales, contextos y tipos celulares. Es activado por IL-1 y TNFα, así como otras citoquinas proinflamatorias y PAMP/DAMP.^{65 66}

5) MCP-1

Es una quimioquina producida principalmente por células epiteliales, endoteliales, músculo liso, monocitos, macrófagos, fibroblastos, astrocitos y microglía. Tiene un papel importante en el proceso inflamatorio, donde favorece el reclutamiento y activación de monocitos. Tiene un papel también en la producción de especies reactivas de oxígeno y en la resistencia a la insulina. TNFα induce su producción.⁶⁷

2.6 Óxido nítrico y óxido nítrico sintetasas

El NO es la molécula de señalización más pequeña conocida en el cuerpo humano. Está producida por NO sintetasas, que transforman arginina en citrulina, utilizando como cofactores O₂ y la coenzima NDAPH y produciendo NO como resultado de este proceso.

Existen tres subtipos de esta enzima:

nNOS (NO sintetasa neuronal) se encuentra principalmente en neuronas centrales y periféricas y tiene funciones relacionadas con el aprendizaje, la memoria y la neurogénesis⁶⁸.

eNOS (NO sintetasa endotelial) se encuentra en células endoteliales principalmente.

Produce vasodilatación, relajando el músculo liso vascular. Estimula la angiogénesis. Inhibe la adhesión de leucocitos y la inflamación inhibiendo MCP1⁶⁹ así como las moléculas de adhesión de leucocitos CD11/18.⁷⁰ Ha demostrado tener también la capacidad de inhibir la apoptosis.⁷¹

iNOS (NO sintetasa inducible) es inducible y no se encuentra de forma constitutiva, pero puede ser inducida por lipopolisacáridos bacterianos, citoquinas y otros agentes. Su expresión es mediada también por NFκB.⁷² Se encuentra principalmente en macrófagos y neutrófilos, y produce elevadas cantidades de NO que resultan dañinas para patógenos, células tumorales, etc, pero también pueden dañar los tejidos del huésped.⁷³ Esta producción excesiva de NO también parece jugar un papel importante en el desarrollo de hipotensión y la situación de shock distributivo que se produce durante la sepsis.⁷⁴

3. El Glicocálix

El glicocálix es la capa más luminal de los vasos sanguíneos. Se trata de una compleja matriz de proteoglicanos, glicoproteínas y proteínas solubles que recubre el interior del endotelio vascular y juega un importante papel en el intercambio de fluidos entre los vasos y los tejidos. Los proteoglicanos, los syndecans y glypicans, forman una superestructura a la que se unen las cadenas de glucosaminoglicanos, incluyendo ácido hialurónico, heparán, condroitin, dermatán y queratán sulfatos, mediante cadenas laterales de polisacáridos cargadas negativamente.⁷⁵

Entre los papeles del glicocálix están la regulación de la permeabilidad vascular y el intercambio de fluidos,⁷⁶ actuar como sensor y transductor de fuerzas mecánicas para el endotelio,⁷⁷ regulando la producción de NO en respuesta a estos estímulos mecánicos⁷⁸ y regular la interacción de las diferentes células sanguíneas con el endotelio.⁷⁹

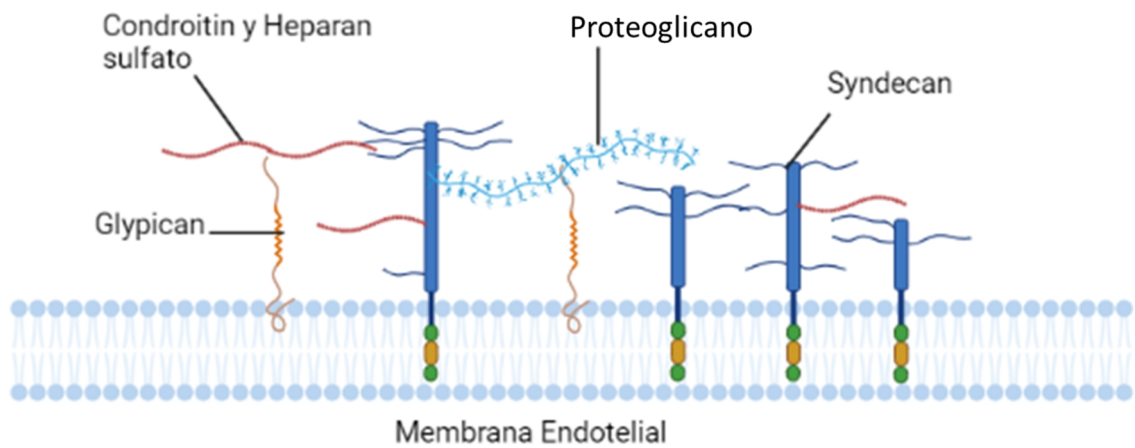


Fig 4: Estructura del glicocalix

El glicocálix es una estructura relativamente frágil, por lo que existen una multitud de procesos que han demostrado ocasionar daño directo al mismo. En primer lugar, la inflamación y la sepsis es bien conocido que producen su degradación mediante diferentes mecanismos. Las metaloproteasas, proteasas producidas durante la inflamación, degradan el syndecan, mientras que heparanasas degradan el heparán sulfato e hialuronidasas y catepsinas degradan el ácido hialurónico.⁸⁰ El propio TNF α , mediador fundamental en la inflamación, ha demostrado por sí mismo aumentar su permeabilidad.⁸¹

Otro mecanismo relevante que ha demostrado dañar el glicocálix y producir disfunción endotelial son las lesiones por isquemia-reperfusión. En este caso el daño está producido principalmente por el resultante estrés oxidativo que conlleva la reperfusión del tejido y la consiguiente producción de ROS.⁸²

Adicionalmente, el shock hemorrágico también ha demostrado, en modelos animales, producir daño al glicocálix, aunque el mecanismo exacto es aún desconocido.⁸³ En contraste a lo

anterior, la secreción de péptido auricular natriurético, producido en situaciones de hipervolemia, también ha demostrado favorecer su degradación.⁸⁴ Por último, la hiperglucemia también se ha ligado a alteraciones en el glicocáliz, aunque aún no está bien caracterizado el mecanismo.⁸⁵

Todos estos sucesos citados anteriormente tienen en común que se dan con frecuencia durante una intervención quirúrgica, especialmente en intervenciones de mayor complejidad, como puede ser la cirugía torácica,²⁵ llevando a la conclusión de que estas intervenciones quirúrgicas conllevan por estos mecanismos la degradación del glicocáliz.⁸⁶

También se ha demostrado que, en los pacientes politraumatizados, que presentan importantes analogías con el paciente quirúrgico, el daño al glicocáliz se asocia a una mayor inflamación, coagulopatía, e incluso una mayor mortalidad.⁸⁷

Este daño al glicocáliz tiene una importancia trascendental en la cirugía pulmonar. Una de las principales consecuencias de este daño son las alteraciones en la permeabilidad capilar, que en el pulmón conlleva la extravasación de líquido al espacio intersticial, desarrollándose edema pulmonar que en última instancia puede conducir al desarrollo de síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA).⁸⁸ Ésta es una complicación de la cirugía torácica que, aunque no es excesivamente frecuente, puede ser grave y conlleva una significativa mortalidad. Según las series la incidencia oscila entre el 2 y el 7%, mientras que la mortalidad es aún más variable, encontrándose series con mortalidad desde 20% hasta 70%.⁸⁹

El SDRA siempre se había puesto previamente en relación con otros factores relacionados con la cirugía, como la agresión quirúrgica, la ventilación mecánica o la fluidoterapia,⁹⁰ pero el daño al glicocáliz y la protección del mismo mediante la técnica anestésica juegan un papel fundamental.⁹¹

3.1 Syndecan

Los syndecan son una familia de glucosaminoglicanos transmembrana, que constituye uno de los principales componentes del glicocálix. Existen diferentes tipos de syndecan, pero los que se han ligado al glicocálix son principalmente 1, 2 y 4.⁹² Los niveles de syndecan 1 están validados en diferentes estudios como marcadores de daño al glicocálix y se han ligado a la aparición de eventos adversos relacionados con procesos inflamatorios como la sepsis, que conllevan degradación del mismo.⁹³ En el paciente politraumatizado también está bien establecido como un marcador de gravedad, que a mayores niveles se correlaciona con peores resultados clínicos, incluyendo una mayor mortalidad.⁹⁴

4. Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada fisiológico que ocurre de forma normal como respuesta al envejecimiento celular y como mecanismo homeostático para mantener las poblaciones celulares adecuadas en los tejidos. También ocurre como mecanismo de defensa como parte de la respuesta inmune cuando las células son dañadas por estímulos nocivos. Es un mecanismo fundamental a la hora de eliminar células inflamatorias tras la respuesta inflamatoria inicial. Es un proceso con una delicada regulación que puede dar lugar a graves patologías si se ve alterado, como alteraciones del desarrollo, enfermedades autoinmunes y tumores.

Existen múltiples vías para dar lugar a la apoptosis. La vía extrínseca está mediada por la unión de ligandos a receptores transmembrana, por ejemplo, FasL/FasR o TNF α /TNFR1. Estos receptores de la familia de receptores TNF comparten un dominio citoplásmico llamado “dominio de muerte” con un rol crítico a la hora de transmitir la señal de inicio de la apoptosis desde la membrana celular a sus mecanismos intracelulares.

La vía de las granzimas o perforinas es utilizada por los linfocitos T citotóxicos CD8 para eliminar células tumorales o infectadas por virus. Aparte de utilizar la vía extrínseca anterior, pueden secretar perforinas, que crean poros transmembrana en las células objetivo a través de los que introducirán las proteasas granzima A y B, iniciando el proceso de apoptosis.

La vía intrínseca está regulada por múltiples factores que pueden tener efectos tanto pro como antiapoptóticos. La presencia o ausencia de determinadas hormonas, citoquinas o factores de crecimiento pueden iniciar o inhibir esta vía. También hay factores iniciadores como radiación, toxinas, radicales libres, hipoxia... Estos estímulos en última instancia producen cambios en la membrana mitocondrial interna que llevan a un aumento de la permeabilidad de las membranas mitocondriales, liberando proteínas proapoptóticas, como el citocromo C, del espacio intermembranal mitocondrial al citosol, dónde inician el proceso de apoptosis.⁹⁵

4.1 La familia BCL-2

Las proteínas de la familia bcl-2 están involucradas en la vía intrínseca de la apoptosis por su papel regulador de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Estas proteínas pueden ser pro o antiapoptóticas, y se encuentran en equilibrio entre sí. Las proteínas de tipo BAX son proapoptóticas, e incluyen entre otras Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk. Las de tipo BCL-2 son antiapoptóticas incluyendo Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XS, Bcl-w y BAG. Existe un tercer subgrupo, el de BH3, que activa las proteínas de tipo BAX, siendo por tanto proapoptótico.

El citocromo C al ser liberado al citosol desde la mitocondria interactúa con la proteína Apaf-1, reclutando posteriormente la procaspasa 9. Estos tres elementos forman el apoptosoma, que lleva a la activación de caspasa 9 e induce la apoptosis. Bcl-2 y otras proteínas de su subgrupo pueden bloquear la liberación de citocromo C al citosol y controlar la activación de las caspasas.⁹⁶ Proteínas proapoptóticas como Bax o Bak pueden formar poros en la

membrana mitocondrial facilitando la salida de citocromo C, mientras que otras como Bad pueden formar heterodímeros con Bcl-2 u otras, inhibiendo su función.⁹⁷

PUMA es otro miembro de la familia Bcl-2 que juega un papel importante en la apoptosis. Su expresión está mediada por *p53*, y se acompaña de sobreexpresión de Bax, traslocación de Bax a la mitocondria y liberación de citocromo C. Tiene por lo tanto un efecto proapoptótico.⁹⁸

99

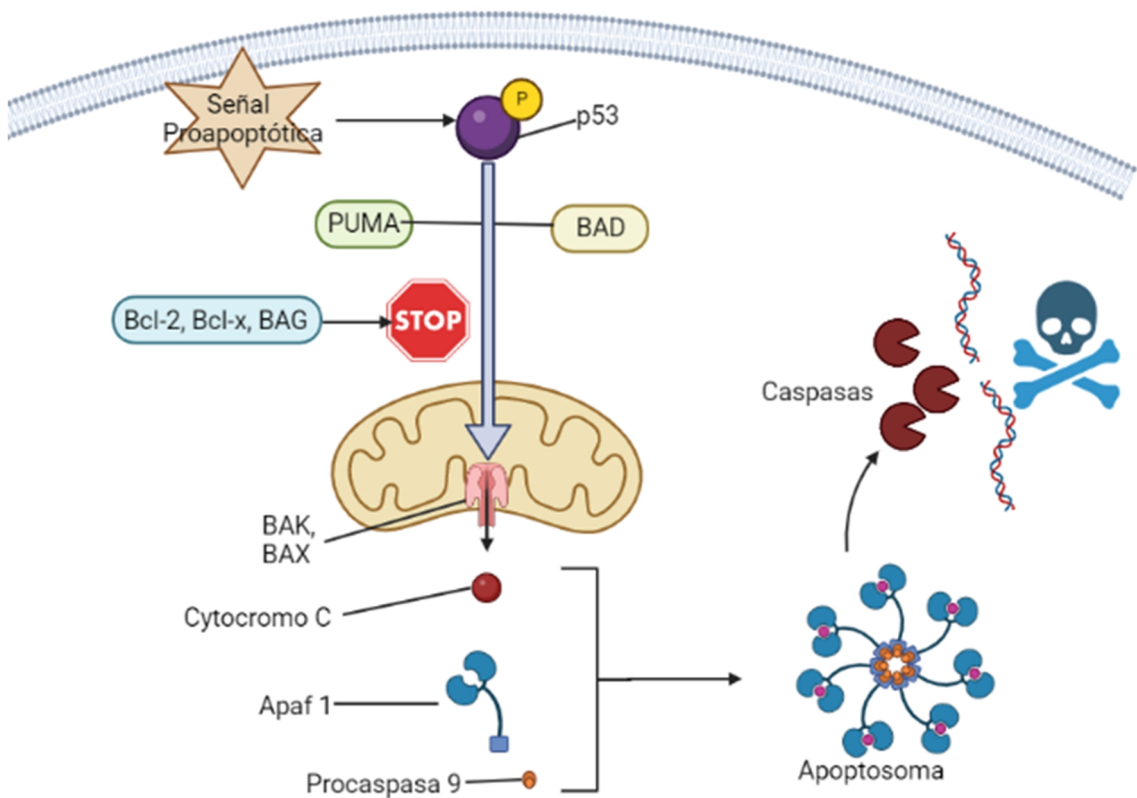


Fig 5: Vía mitocondrial de la apoptosis

4.2 Catepsinas

Las catepsinas son proteasas que en condiciones normales se encuentran dentro del lisosoma. Estas enzimas también están involucradas en el proceso de apoptosis como mediadores. Determinados estímulos, como la activación de TMF-R o el daño oxidativo, pueden conducir a la permeabilización del lisosoma y la salida de catepsina de su interior, participando en la activación de caspasas que posteriormente llevará a la apoptosis celular.¹⁰⁰

La Catepsina B, encontrada en los lisosomas de diferentes células, especialmente células endoteliales, puede ser liberada ante condiciones de estrés y producir daños en el glicocáliz.¹⁰¹

5. El papel del hígado

El hígado es un órgano con una función inmunológica importante. Tiene importantes poblaciones de células del sistema inmune, tanto innato como adaptativo que mantiene un estado homeostático en cuanto a la inflamación. Cuenta con linfocitos T reguladores, T citotóxicos y T helper, así como linfocitos B y células plasmáticas.¹⁰² Los linfocitos T reguladores producen IL-10, una interleuquina con propiedades antiinflamatorias que condiciona un ambiente inmunológico tolerogénico en el hígado.¹⁰³

El hígado tiene una gran población de macrófagos residente, llamados células de Kupffer, que constituyen en torno al 90% de la población fija de macrófagos del cuerpo y aproximadamente un tercio del parénquima hepático.¹⁰⁴ Esto hace que, a pesar del ambiente tolerogénico mencionado, el hígado sea el órgano más importante a la hora de eliminar bacterias y toxinas de la circulación sanguínea, aclarando PAMPs y DAMPs circulantes.¹⁰⁵

El daño pulmonar, como comentamos previamente, puede propagarse a otros tejidos y órganos. El hígado recibe una elevada cantidad de flujo sanguíneo y puede verse afectado por las citoquinas y ROS producidas en el pulmón. El experimento de Esme demostró que la

isquemia-reperfusión pulmonar provocaba daño hepático en conejos, medido mediante el aumento de actividad de la mieloperoxidasa (MPO), que refleja el reclutamiento de neutrófilos por parte del hígado, y el incremento de marcadores de estrés oxidativo tras una hora de isquemia y posterior perfusión pulmonar.¹⁰⁶ Posteriormente estudios de nuestro grupo de investigación han demostrado que el daño pulmonar provocado por isquemia-reperfusión induce una respuesta inflamatoria hepática, aumentando la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1, TNF α y MCP-1, así como NF- κ B en tejido hepático.¹⁰⁷ Múltiples experimentos más han demostrado que mediadores inflamatorios de origen pulmonar al llegar al hígado han demostrado ser capaces de producir una respuesta inflamatoria en este órgano.^{108 109} El experimento de Walker demostró que parámetros ventilatorios más lesivos conllevan una mayor liberación de marcadores inflamatorios a la sangre, con mayor afectación hepática, demostrando que la ventilación mecánica juega un papel fundamental en este proceso.¹⁰⁹

Una de las funciones principales del hígado es la síntesis de gran parte de las proteínas plasmáticas, incluyendo proteínas clave para la respuesta inmune como el sistema de complemento. También tiene una función importante respondiendo a la inflamación de otros puntos del organismo. Las citoquinas producidas en otros tejidos pasan a la circulación y son detectadas por hepatocitos, que inician la reacción de fase aguda a nivel sistémico, incrementando la producción de proteínas de fase aguda enormemente.¹¹⁰

El hígado, por lo tanto, es un motor fundamental de la respuesta inflamatoria sistémica. En lo relativo a la inflamación pulmonar la participación del hígado juega también un papel importante. Como hemos establecido, la respuesta inflamatoria pulmonar puede elucidar una respuesta similar en el hígado. Esta respuesta inflamatoria hepática a su vez retroalimenta la inflamación pulmonar, pudiendo perpetuarla hasta el punto de producir SDRA. El experimento de Siore ilustra muy bien esta secuencia. En un modelo porcino de sepsis, administrando

endotoxina a los pulmones y excluyendo al hígado de la circulación sistémica, no se desarrolla SDRA ni se produce una elevación significativa de muchas citoquinas, mientras que al incluir el hígado en la circulación se produce edema pulmonar, hipoxemia y niveles significativamente aumentados de $TNF\alpha$, IL-6 y $NF\kappa B$.¹¹¹

Patterson profundiza en este modelo de interacción entre pulmón e hígado, demostrando que los marcadores inflamatorios producidos en el pulmón por el daño asociado a la ventilación mecánica pasan a la sangre, incluyendo $TNF\alpha$, IL-1 e IL-6, llegando al hígado. En el hígado se produce la propagación de esta respuesta inflamatoria mediada por $NF\kappa B$, liberando el hígado mayores cantidades de los mediadores inflamatorios mencionados a la sangre, retroalimentando así la respuesta inflamatoria pulmonar.¹¹²

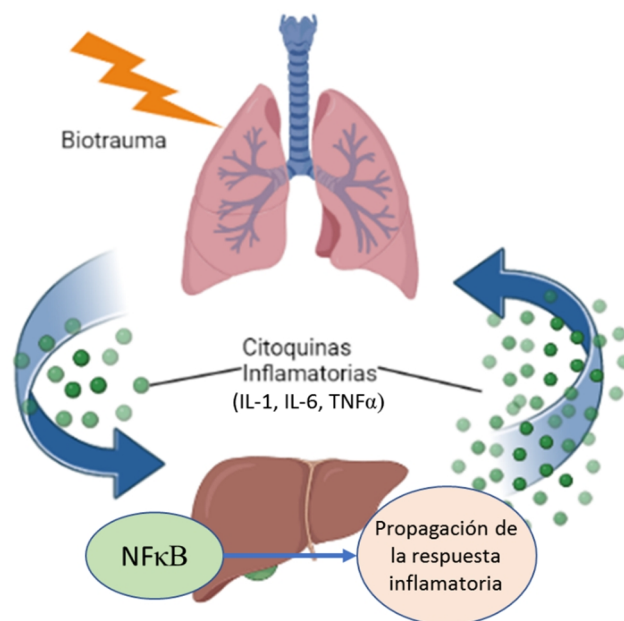


Fig 6: Relación entre el pulmón y el hígado en respuesta al biotrauma

6. Sistema Nervioso Simpático.

6.1 Generalidades

El sistema nervioso simpático (SNS) es una parte del sistema nervioso autónomo que se caracteriza por ser responsable de la respuesta de “lucha o huida”. Anatómicamente, las neuronas preganglionares del SNS se encuentran en el asta lateral de la sustancia gris de la médula espinal, únicamente en la región toracolumbar. Los axones de estas neuronas preganglionares discurren por la raíz anterior para contactar con las neuronas postganglionares, usando como neurotransmisor la acetilcolina.

Las neuronas postganglionares se distribuyen en dos grupos cadenas ganglionares: las cadenas paravertebrales, situadas a ambos lados de la médula; y la cadena prevertebral, delante de la médula. Las neuronas postsinápticas de las cadenas paravertebrales envían sus axones a la musculatura lisa de vasos y folículos capilares, a glándulas sudoríparas, nasales, lacrimales y salivales, así como al corazón y los pulmones mediante el ganglio estrellado. Las neuronas de la cadena prevertebral, por su parte, inervan los órganos y vísceras abdominales. El neurotransmisor que utilizan estas neuronas postganglionares es principalmente la noradrenalina, aunque la vasculatura muscular, folículos pilosos y glándulas sudoríparas son también colinérgicas.

Existe otra opción eferente para las neuronas preganglionares, pudiendo contactar con células cromafines de la médula adrenal, que serían equivalentes en este caso a las neuronas postganglionares. Estas células van a secretar adrenalina directamente al torrente sanguíneo.¹¹³

Estas catecolaminas, noradrenalina y adrenalina, producidas por el SNS van a actuar sobre diferentes receptores adrenérgicos. Existen dos grandes subtipos: α , dividido a su vez en $\alpha 1$ y $\alpha 2$; y β , dividido en $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$. A continuación se incluye una breve reseña de sus funciones principales.¹¹⁴

Receptor	Localización Principal	Acción
α_1	Músculo liso incluyendo: vascular, gastrointestinal, urinario, bronquiolar, etc. Corazón	Vasoconstricción, retención urinaria, menor motilidad gastrointestinal, inotropismo cardiaco positivo, dilatación pupilar, sudoración, glucogenolisis y gluconeogénesis.
α_2	Neuronas simpáticas presinápticas, islotes de Langerhans, plaquetas	Feedback negativo en neuronas del SNS, inhibición de secreción de insulina y glucagón pancreáticos, agregación plaquetaria, sedación.
β_1	Corazón	Cronotropismo e inotropismo positivo.
β_2	Músculo liso incluyendo: vascular, gastrointestinal, urinario, bronquiolar, etc. Hígado	Vasodilatación, broncodilatación, relajación de músculo liso en útero, vías urinarias, tracto gastrointestinal... glucogenolisis y gluconeogénesis
β_3	Tejido adiposo	Lipolisis incrementada

Tabla 1: Funciones principales de los diferentes receptores adrenérgicos. SNS: Sistema Nervioso Simpático.

6.2 SNS e Inflamación

La agresión quirúrgica produce de una respuesta fisiológica que se caracteriza entre otras cosas por la activación del SNS. La activación por el hipotálamo del sistema nervioso simpático produce la liberación de catecolaminas por la médula adrenal. El efecto más evidente de estas catecolaminas consiste en mediar la respuesta hemodinámica de taquicardia e hipertensión, pero también están relacionadas con la respuesta inflamatoria.

La relación entre el sistema nervioso simpático y la inflamación se conoce desde hace más de un siglo. En 1903 Meltzer secciona el sistema nervioso de la oreja de conejos tras provocar inflamación inoculándolos con estafilococos, concluyendo que estos nervios tienen una relación con la inflamación que va más allá de la vasoconstricción y vasodilatación.¹¹⁵ Todavía no estaba bien caracterizada esta relación, pero a lo largo de las siguientes décadas se iría precisando.

El SNS se encuentra en estrecha relación con las células del sistema inmune implicadas en la inflamación, y mantienen una compleja relación entre sí, en la que se establece una comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el sistema nervioso central (SNC). Por un lado, los mediadores proinflamatorios liberados por las células del sistema inmune tras un estímulo inflamatorio resultan en la activación del SNC.¹¹⁶ Esto tiene lugar por dos mecanismos. En primer lugar, por los mediadores inflamatorios liberados a la circulación, que pueden ejercer una acción directa sobre núcleos cerebrales; y en segundo lugar por la capacidad de dichos mediadores de estimular o disminuir el umbral de excitación de fibras nociceptivas y vagales aferentes a nivel local.¹¹⁷ En esta comunicación con el sistema nervioso intervienen citoquinas como la IL-1 β ¹¹⁸ o el TNF α .¹¹⁹

Por el otro lado, el tejido linfoide, en particular el secundario, tiene inervación por parte de fibras nerviosas simpáticas. En este tejido, las terminaciones de los nervios simpáticos se encuentran próximas a las células del sistema inmune,¹²⁰ permitiendo la liberación de noradrenalina por parte de las neuronas del SNS en las inmediaciones de estas células. En consecuencia, múltiples células del sistema inmune, incluyendo los neutrófilos, las principales células efectoras de la respuesta inflamatoria, expresan receptores para neurotransmisores en su superficie, incluyendo receptores adrenérgicos.^{121 122}

El efecto de estas catecolaminas sobre la respuesta inmune es complejo y continúa siendo un área de la inmunología en investigación. Clásicamente se pensaba que su efecto era supresor de la inmunidad adaptativa, inhibiendo la función linfocitaria. No obstante, su función es más compleja, activando los linfocitos T CD4+ y linfocitos B, por lo que tiene una función reguladora de esta inmunidad más allá de ser únicamente activador o supresor.¹²³

Sobre la inmunidad innata también tiene un efecto netamente inhibitor. En un ensayo con voluntarios sanos se observó que la activación del SNS tras la administración de un estímulo inflamatorio conducía a una mayor liberación de la citoquina antiinflamatoria IL-10, y menor de

las citoquinas antiinflamatorias TNF α , IL-6 e IL-8.¹²⁴ No obstante esta relación es complicada, ya que existe también evidencia de que la inhibición del SNS puede producir descenso de TNF α en determinados pacientes.¹²⁵

Los receptores adrenérgicos expresados por las células inmunes son α 1, α 2 y, principalmente, β 2. Estos receptores parecen tener efectos contradictorios, siendo α principalmente promotor de la respuesta inmune mientras que β 2 tiene un efecto más inhibitor. No obstante, en células efectoras de la inmunidad innata, es el efecto β 2 el que tiene mayor peso en condiciones normales.¹²⁶

Las catecolaminas, y en concreto la activación β 2, ha demostrado en diferentes estudios reducir las citoquinas proinflamatorias. Ha demostrado reducir la producción de TNF α , IL-1 e IL-6 por parte de diferentes células de la inmunidad innata.^{127 128 129} También ha demostrado reducir la quimiotaxis y activación de los neutrófilos, así como su capacidad para producir ROS.^{130 131} De similar manera, la estimulación β 2 ha demostrado también reducir la activación de los macrófagos y su secreción de citoquinas proinflamatorias.¹³² Adicionalmente ha demostrado tener un efecto apoptótico directo en varias células del sistema inmune en órganos linfoides como el bazo.¹³³ Por el contrario, la estimulación de estos mismos receptores aumenta la cantidad de granulocitos y células NK circulantes,¹³⁴ si bien existe también evidencia de un efecto inhibitor sobre las células NK.¹³⁵

La activación de los receptores α 2, no obstante, tiene un efecto proinflamatorio, estimulando la liberación de citoquinas proinflamatorias, como TNF α .¹³⁶

El papel de los receptores β 1 de cara a la inflamación parece ser menos significativo que los anteriores, no obstante, se ha comprobado experimentalmente que la estimulación de estos receptores tiene un efecto proinflamatorio en monocitos.¹³⁷

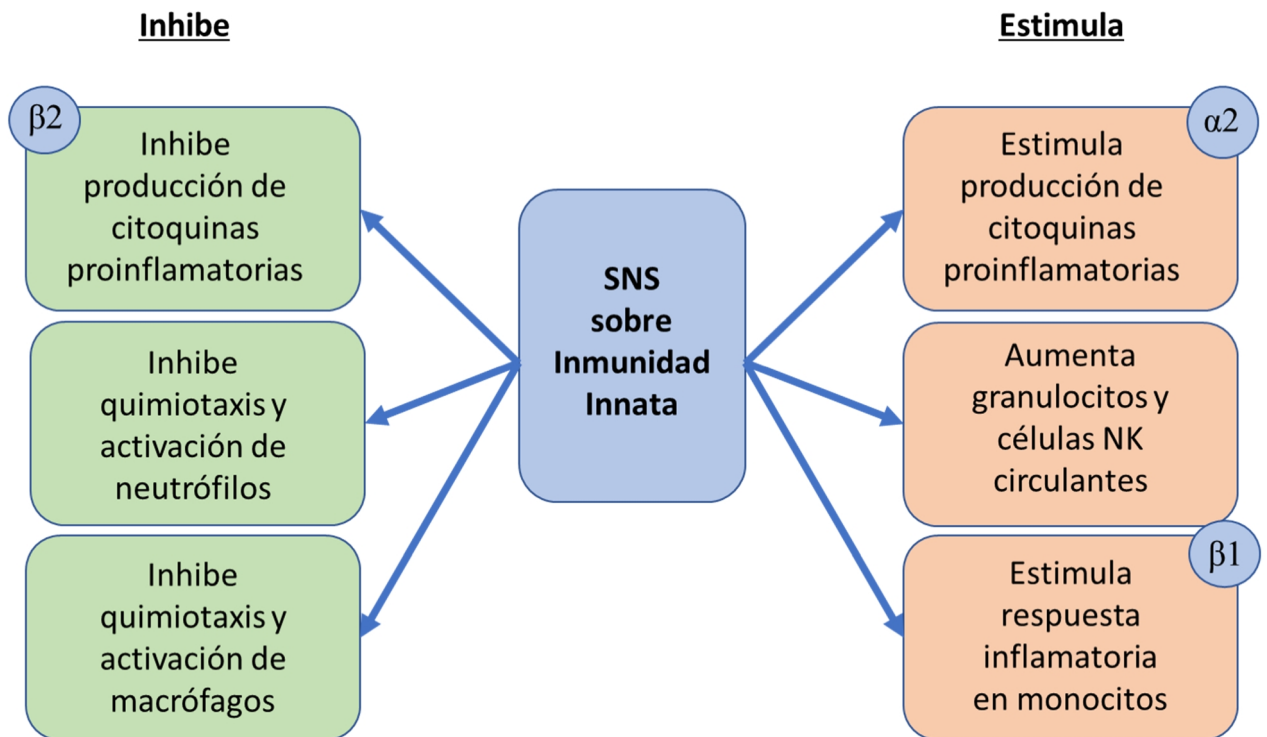


Fig 7: Resumen de efectos del SNS sobre la inmunidad innata. SNS: Sistema Nervioso Simpático. NK: Natural Killer

6.3 Hígado y Sistema Nervioso Simpático

El hígado está inervado por el SNS a través de los ganglios celíaco y mesentérico superior.¹³⁸ Las terminaciones de estos nervios simpáticos se encuentran cerca de vasos sanguíneos, así como en contacto directos con hepatocitos, células estrelladas y células endoteliales sinusoidales.¹³⁹ A pesar de que pueden existir catecolaminas circulantes, esta inervación parece ser la principal fuente de noradrenalina y adrenalina en el tejido hepático en condiciones fisiológicas, como se demuestra por el descenso en las concentraciones de las mismas que se observa en hígados trasplantados que se encuentran denervados.¹⁴⁰

El efecto netamente inhibitorio de la inmunidad innata del SNS que hemos discutido previamente contrasta con lo observado en el hígado. Se ha observado que la presencia de noradrenalina, especialmente en situaciones de elevada actividad inflamatoria como la sepsis,

produce liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de las células de Kupffer, incluyendo TNF α , IL-1 e IL-6, estando este fenómeno mediado por receptores $\alpha 2$.¹⁴¹

Similarmenete, la noradrenalina también produce un aumento en la secreción de citoquinas inflamatorias por parte de las células estrelladas, mediado por NF κ B.¹⁴²

Este fenómeno se explica, por un lado, por la expresión aumentada de receptores $\alpha 2$ en las células de Kupffer, con un efecto proinflamatorio como mencionamos previamente. Por otro lado, situaciones de inflamación descontrolada como la sepsis pueden dar lugar a una sobreexcitación mantenida del SNS, dando lugar a una mayor producción de noradrenalina, que pase de tener un efecto local a verse en la circulación sanguínea. Esto es especialmente cierto en el intestino, donde la noradrenalina se vierte a la circulación portal y por lo tanto llega al hígado, a una concentración adecuada para estimular los receptores α de forma selectiva produciendo la respuesta proinflamatoria. Este fenómeno ha sido denominado por algunos autores “excitotoxicidad simpática”.^{143 144} Este mecanismo mediado por noradrenalina entérica también tiene un papel importante a la hora de producir disfunción hepática en el contexto de sepsis.¹⁴⁵

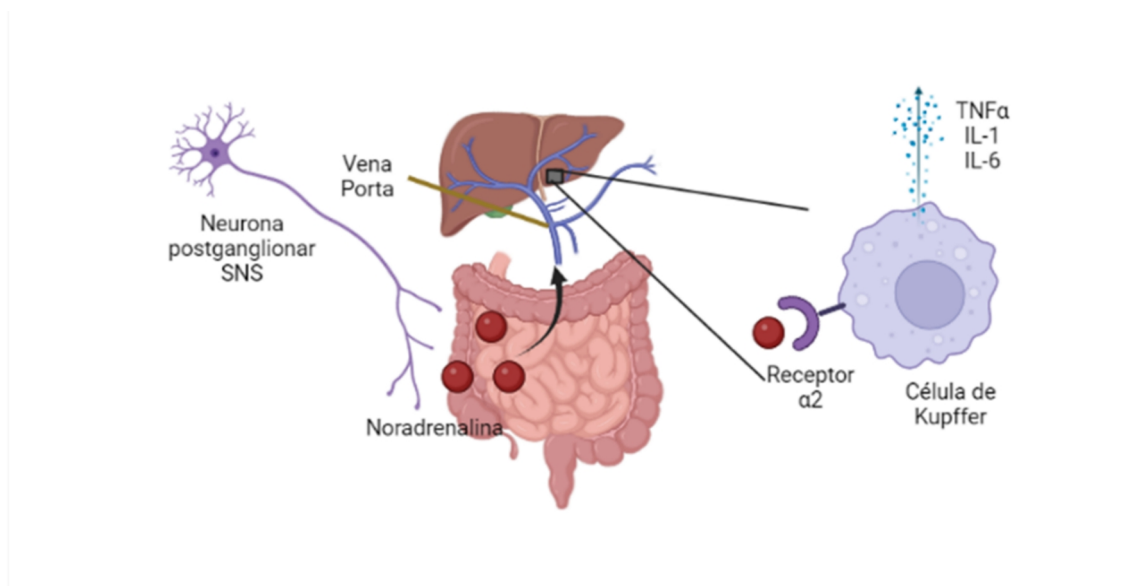


Fig 8: Relación entre sistema nervioso simpático e hígado. SNS: Sistema Nervioso Simpático.

6.4 Sistema Nervioso Parasimpático e Inflamación

En contraste al SNS, el sistema nervioso parasimpático (SNP), tiene un efecto más inequívoco sobre la inmunidad innata, y por ende la inflamación. La activación del SNP tiene un efecto claramente antiinflamatorio.¹⁴⁶ La acetilcolina liberada por el nervio vago, uno de los elementos principales del SNP, ha demostrado reducir la producción de TNF α por parte de los macrófagos en respuesta a endotoxina.¹⁴⁷ También tiene un efecto inmunosupresor mediado a priori por linfocitos T.¹⁴⁸ Similarmente, la activación de los receptores de acetilcolina en las células T produce un descenso en moléculas de adhesión y en la proliferación linfocitaria.¹⁴⁹

7. Betabloqueantes y Esmolol

Los betabloqueantes son un grupo heterogéneo de fármacos que tienen en común su capacidad para antagonizar la activación por parte de las catecolaminas de los receptores β adrenérgicos de forma competitiva en virtud de sus similitudes estructurales con dichas catecolaminas. Propranolol fue el primer betabloqueante aprobado para el tratamiento de la hipertensión arterial y desde entonces se han introducido nuevos fármacos en esta familia terapéutica y se han ampliado sus indicaciones.¹⁵⁰

Entre los factores diferenciadores entre los betabloqueantes disponibles comercialmente destaca su capacidad para bloquear selectivamente el receptor β_1 ; así como su actividad simpaticomimética intrínseca, es decir, su capacidad para estimular parcialmente los propios receptores β . También se diferencian en cuanto a su duración y su metabolismo.

Entre sus indicaciones clínicas principales se encuentran el tratamiento de:

- Hipertensión arterial.
- Arritmias.

- Eventos isquémicos cardiacos.
- Insuficiencia cardiaca.
- Algunos tipos de temblores.
- Profilaxis de sangrado por varices esofágicas.

Por lo tanto, la mayoría de sus usos clínicos se derivan de su efecto cardiovascular, al bloquear los efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos mediados por los receptores β mencionados previamente.

Dada la relación entre el sistema nervioso simpático y la inflamación, existen cada vez más estudios que analizan las propiedades inmunoregulatoras de los betabloqueantes en situaciones de estrés inflamatorio.

En pacientes con sepsis con tratamiento previo con betabloqueantes se ha demostrado un descenso en la mortalidad,¹⁵¹ así como otros efectos, incluyendo reducción en la disfunción respiratoria y neurológica.¹⁵² También se ha demostrado una mejora de la supervivencia en pacientes con traumatismos craneoencefálicos con tratamiento previo con betabloqueantes, incluso a pesar de la peor situación premórbida y edad más avanzada de estos pacientes,¹⁵³ habiéndose demostrado posteriormente mediante ensayo clínico.¹⁵⁴

Dentro del ámbito quirúrgico está bien establecido el beneficio que supone continuar con un tratamiento betabloqueante crónico durante el perioperatorio en cuanto al aumento en la supervivencia que ello conlleva.¹⁵⁵ Cabe por lo tanto plantearse la posibilidad de que introducir un tratamiento betabloqueante pueda ser beneficioso previo a una cirugía. No obstante, la introducción de betabloqueantes durante el periodo perioperatorio en pacientes sin este tratamiento previamente ha demostrado, a pesar de reducir los eventos isquémicos cardiacos, aumentar la incidencia de bradicardia e hipotensión, de ictus, y en última instancia incrementar la mortalidad.¹⁵⁶

7.1 Esmolol

El esmolol es un fármaco betabloqueante, selectivo para receptores β_1 adrenérgicos. No posee actividad simpaticomimética intrínseca ni efecto estabilizador de membrana a dosis terapéuticas. Su uso está aprobado para tratamiento de taquicardia supraventricular (excepto para los síndromes de preexcitación) o taquicardia sinusal no compensada, y para taquicardia e hipertensión arterial que se producen en la fase perioperatoria.¹⁵⁷

El fármaco tiene una semivida de distribución del orden de 2 minutos, con una semivida de eliminación del orden de 9 minutos, por lo que tiene un efecto rápido y la duración de sus efectos es muy corta, permitiendo que la dosis se pueda ajustar rápidamente. El esmolol es metabolizado mediante la hidrólisis del grupo éster por las esterasas presentes en los glóbulos rojos, produciendo un metabolito ácido (ASL-8123), con una débil acción betabloqueante (menos del 0,1% de esmolol), y metanol. El esmolol se elimina por vía renal, en parte sin modificar (menos del 2% de la dosis administrada) y en parte en forma de ASL-8123.

La dosis terapéutica inicial del esmolol incluye una dosis de carga de 500 microgramos/kg/minuto durante 1 minuto, seguida de una perfusión de mantenimiento de 50 microgramos/kg/minuto. A partir de ahí se puede aumentar la dosis hasta obtener el efecto deseado.

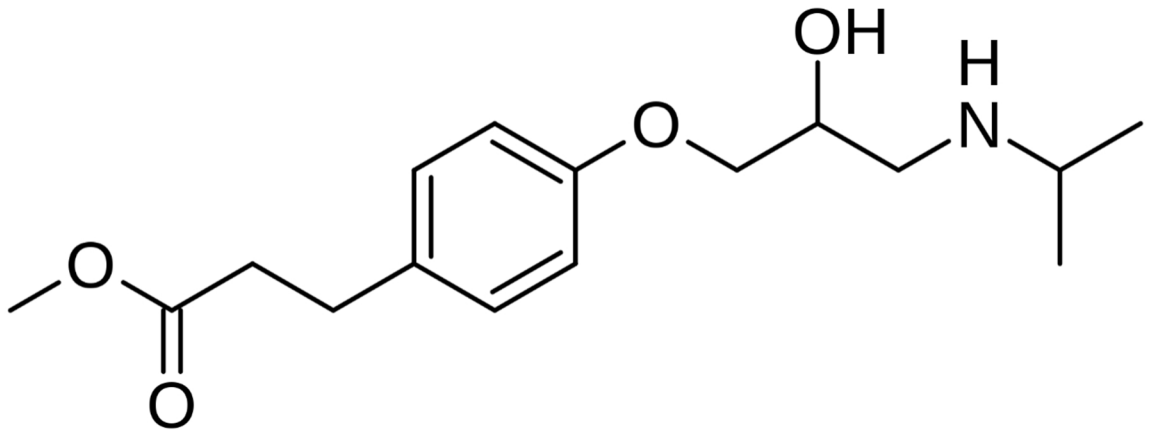


Fig 9: Estructura química del esmolol

Usos no hemodinámicos del Esmolol

A pesar de su indicación para el tratamiento de la taquicardia y la hipertensión perioperatoria, el esmolol ha demostrado tener utilidad más allá de ese ámbito.

Uno de los usos posibles de esmolol es como coadyuvante analgésico durante el periodo postoperatorio. En este sentido ha demostrado reducir las necesidades de opioides en el periodo postoperatorio sin obtenerse una peor analgesia.¹⁵⁸ Son múltiples las razones que se barajan para explicar este efecto. Por un lado tenemos los efectos cardiovasculares del fármaco, al reducir el gasto cardiaco podría modificar la farmacocinética de los analgésicos administrados, aumentando así su duración. No obstante, también su efecto antiinflamatorio (que exploraremos a continuación) se ha propuesto como explicación, ya que IL-1 y 6 producen sensibilización al dolor. También tiene la capacidad de producir un efecto inhibitorio sobre las neuronas de la raíz dorsal en la médula espinal, que conducen estímulos nociceptivos al sistema nervioso central.¹⁵⁹

Otro posible efecto de los betabloqueantes es el de reducir la progresión metastásica de determinados tumores. Este efecto está siendo investigado a raíz de del conocido efecto que puede tener la activación del SNS promoviendo la progresión tumoral y su diseminación

sanguínea.¹⁶⁰ Existe evidencia prometedora con otros betabloqueantes administrados en el periodo perioperatorio, que sugiere que el landiolol puede mejorar el pronóstico oncológico en cirugía de resección pulmonar y el propranolol en cirugía colorrectal.^{161 162} Con esmolol no existe aún evidencia en este aspecto y se necesitan todavía más estudios para esclarecer verdaderamente esta utilidad del betabloqueo.

Esmolol e inflamación

El bloqueo de receptores β_1 por parte de esmolol produce un efecto cronotrope e inotropo negativo, explicando sus indicaciones terapéuticas. Por ello resulta llamativo que existan múltiples estudios que administran esmolol en situación de shock cardiogénico y encuentran mejorías en la función cardíaca o la perfusión distal.^{163 164 165}

Este sorprendente resultado se puede explicar por varios mecanismos. En primer lugar, el efecto anti-isquémico que ejerce el bloqueo β_1 debido precisamente a su efecto crono e inotrópico negativo, reduciendo el consumo de oxígeno del miocardio y mejorando su perfil metabólico en un momento en el que la entrega de oxígeno a los tejidos puede estar comprometido.¹⁶⁶ En segundo lugar, puede frenar el ciclo de regulación a la baja y desensibilización de receptores adrenérgicos producido por la descarga masiva de catecolaminas en la sepsis, que resulta en depresión de la función cardíaca.¹⁶³ Por último, debemos considerar sus efectos como modulador de la respuesta inflamatoria, teniendo en cuenta la disminución de $\text{TNF}\alpha$ que produce en el experimento de Suzuki, una citoquina que a su vez ha demostrado estar ligada a la depresión miocárdica.¹⁶⁷

El Experimento posterior Wei, administraba unas dosis menores de esmolol, sin efecto cronotrope, a ratas en situación de shock séptico, demostrando tener un efecto beneficioso sobre la función cardíaca y la vasoreactividad a pesar de no modificar la frecuencia cardíaca de

los sujetos.¹⁶⁸ Esto ciertamente resta potencia a la teoría de que su efecto positivo se deba al cronotropismo negativo que produce el betabloqueo, y se la añade a su papel como modulador de la respuesta inflamatoria.

Diferentes ensayos con esmolol han demostrado efectos positivos que pueden estar en relación con este efecto inmunomodulador. Ha demostrado disminuir el daño de isquemia-reperusión en modelos animales.¹⁶⁹ En humanos ha demostrado también reducir el estrés oxidativo, en situaciones en las que éste se ve exacerbado, como el infarto agudo de miocardio.¹⁷⁰ En situación de shock séptico ha demostrado disminuir la expresión de citoquinas proinflamatorias,¹⁷¹ así como tener un efecto como protector de la función endotelial.¹⁶⁴

El mecanismo exacto por el cual el esmolol produce este efecto inmunorregulador es controvertido. Uno de los principales mecanismos que se postulan es que su bloqueo altamente selectivo de los receptores β_1 adrenérgicos resulte en una estimulación preferente de los receptores β_2 por parte de las catecolaminas circulantes,¹⁷¹ un receptor que como observamos previamente tiene la capacidad de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias, y por lo tanto un efecto netamente antiinflamatorio. También hay que considerar el efecto proinflamatorio que ejercen los propios receptores β_1 en monocitos, y que se evitaría con su bloqueo, aunque estos receptores sean menos prevalentes que los β_2 .¹³⁷

Estos efectos podrían ser útiles para atenuar la respuesta inflamatoria en cirugía, dónde intervienen los mecanismos antes citados. Se han realizado ensayos en gastrectomías laparoscópicas, demostrando una reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias.¹⁷²

173

La cirugía de resección pulmonar con VUP presenta un desafío mayor, al producir una respuesta inflamatoria superior, como ya hemos establecido. Otro problema que plantea la cirugía pulmonar en relación con la utilización del esmolol es que buena parte de los pacientes

sometidos a estas cirugías sufren patología pulmonar, tanto restrictiva como obstructiva. Clásicamente la administración de betabloqueantes ha estado siempre relativamente contraindicada en pacientes con patología pulmonar obstructiva, especialmente asma.¹⁵⁰ El esmolol es, no obstante, un fármaco cardioselectivo que carece de efectos sobre la resistencia de la vía aérea, por lo que puede ser un betabloqueante de elección para estos pacientes.¹⁷⁴ De hecho, una revisión sistemática de la Cochrane en 2005 no encontró un aumento de riesgo en pacientes EPOC a la hora de administrarse betabloqueantes cardioselectivos.¹⁷⁵ En la ficha técnica del fármaco se recoge la contraindicación de administrarlo durante una crisis asmática aguda, pero no en pacientes con asma u otras enfermedades obstructivas del flujo aéreo.¹⁵⁷

Autor	Año	Resumen	Referencia
Roth, E	1991	La infusión de esmolol reduce el daño causado por radicales libres durante la reperfusión en un modelo de isquemia cardiaca en perros.	176
Daga, M	2003	El tratamiento con esmolol reduce el estrés oxidativo en pacientes con infarto agudo de miocardio.	170
Suzuki, T	2005	La infusión de esmolol atenúa la disfunción miocárdica en un modelo de sepsis en ratas.	163
Gore, D	2006	El tratamiento con esmolol reduce el gasto cardiaco en pacientes sépticos, sin afectar la utilización de oxígeno.	177
Fanelop, T	2008	La infusión de esmolol atenúa la disfunción sistólica tras bypass cardiaco en un modelo de cirugía cardiaca en cerdos.	178
Mori, K	2011	La infusión de esmolol preserva la función de barrera intestinal en un modelo de sepsis en ratas.	179
Morelli, A	2013	El tratamiento con esmolol en pacientes sépticos reduce la mortalidad y la necesidad de fármacos vasoactivos.	180
Ibrahim-zada, I	2013	Dosis de esmolol sin efecto cronotropo disminuyen la mortalidad en un modelo murino de sepsis.	181
Kim, Y	2013	La infusión de esmolol mitiga la respuesta inflamatoria postoperatoria en pacientes sometidos a gastrectomía laparoscópica.	172
Kim, Y	2015	El esmolol mitiga la respuesta inflamatoria postoperatoria en pacientes sometidos a gastrectomía laparoscópica de forma dosis-dependiente.	173
Kimmoun, A	2015	La infusión de esmolol mejora la contractilidad cardiaca y respuesta a las catecolaminas en un modelo de shock séptico en ratas.	164
Hernández, G	2016	La infusión de esmolol mejora el aclaramiento de lactato en un modelo de shock séptico en ovejas.	165
Wei, C	2016	Dosis de esmolol sin efecto cronotropo mejoran la función cardiaca y vasorreactividad en un modelo de shock séptico en ratas.	168
Shang, X	2016	La infusión de esmolol reduce el tiempo de ventilación mecánica en pacientes con sepsis grave, sin efectos adversos hemodinámicos.	182
Du, W	2016	El tratamiento con esmolol aumenta el volumen sistólico pero disminuye el gasto cardiaco en pacientes con sepsis, sin alterar el consumo de oxígeno.	183
Zhang, L	2016	El esmolol disminuye la lesión pulmonar e inflamación en ratas con pancreatitis aguda.	184
Lu, Y	2017	La infusión de esmolol disminuye la inflamación y apoptosis en ratas sépticas con infección abdominal.	185
Guo, CA	2020	El esmolol inhibe la inflamación y la apoptosis en tejido intestinal en ratas sépticas.	186
Cocchi, M	2022	El tratamiento con esmolol no reduce las necesidades de vasopresores ni el tiempo hasta la resolución del shock en pacientes sépticos.	187

Tabla 2: Resumen de estudios clínicos y experimentales realizados con esmolol en relación a la respuesta

inflamatoria. 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

El antagonismo farmacológico de los receptores betaadrenérgicos, mediante la administración perioperatoria de una perfusión continua de esmolol, podría atenuar la respuesta inflamatoria asociada al estrés que conlleva la cirugía de resección del parénquima pulmonar con periodo de ventilación unipulmonar en un modelo experimental porcino.

Objetivo principal

Analizar el efecto de una perfusión continua perioperatoria de esmolol intravenoso sobre la respuesta inflamatoria sistémica en el intra y perioperatorio de un modelo experimental de cirugía de resección pulmonar.

Objetivos secundarios

Investigar el efecto de este tratamiento sobre el daño producido al glicocálix y la disfunción endotelial, con la hipótesis de que se atenuará el daño producido por la cirugía y la VUP.

Investigar el efecto del esmolol sobre la apoptosis hepática que pueda estar ocasionada por la cirugía.

Investigar los cambios hemodinámicos y respiratorios ocasionados por el tratamiento.

Material y Métodos

El estudio se realizó con la autorización de los Comités de Investigación y de Ética en Experimentación Animal del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Todos los procedimientos se realizaron respetando la normativa legal vigente, tanto española como europea, sobre el manejo de animales de experimentación, en especial lo estipulado por la Ley 32/2007, del 7 de noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, y por el Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia.

Los experimentos con animales fueron realizados en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.



Fig 10: Quirófano de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón

1. Sujetos Experimentales

Se utilizaron como sujetos del estudio cerdos adultos de la raza Large-White. Fueron 24 animales con peso medio de 40 +/- 5 kg. Los animales fueron proporcionados por el Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (iMiDRA), a través de la Finca Experimental La Chimenea, en Aranjuez. El traslado de los animales desde la finca hasta el centro de investigación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón se realiza 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, en una jaula individual, donde permanece el animal hasta el momento de la intervención. El animalario dispone de un ambiente controlado con 20-22°C y una humedad del 55%.

Los sujetos fueron asignados de forma aleatoria a uno de tres grupos experimentales: CONTROL, ESMOLOL y SHAM. Cada grupo experimental se compone de 8 animales. La asignación aleatoria se realizó usando en programa informático Excel (Microsoft Corp, Seattle, EEUU).

El grupo ESMOLOL recibió la administración inmediatamente a continuación de la inducción anestésica de un bolo de esmolol (Brevibloc, Baxter S.L., Ribarroja del Turia, Valencia, España) de 0,5 mg/kg, seguido de una perfusión continua de esmolol durante todo el procedimiento quirúrgico de 0,05 mg/kg/min. Fue sometido a una cirugía de resección pulmonar, resecándose lóbulo caudal izquierdo con ventilación unipulmonar bajo anestesia general.

Al grupo CONTROL le fue administrado tras la inducción anestésica un bolo de suero salino 0,9%, seguido de una perfusión continua de suero de forma que resulte en el mismo volumen que la dosis de esmolol correspondiente para el grupo ESMOLOL. Se realizó una cirugía de resección del lóbulo caudal izquierdo con ventilación unipulmonar bajo anestesia general, de la misma forma que el grupo ESMOLOL.

La administración de esmolol y suero salino se realizó de forma cegada con jeringas preparadas previamente sin marcar.

El grupo SHAM fue anestesiado de la misma forma que los grupos anteriores sometido a una toracotomía bajo anestesia general, con ventilación mecánica bipulmonar, sin realizarse resección pulmonar o ventilación unipulmonar.

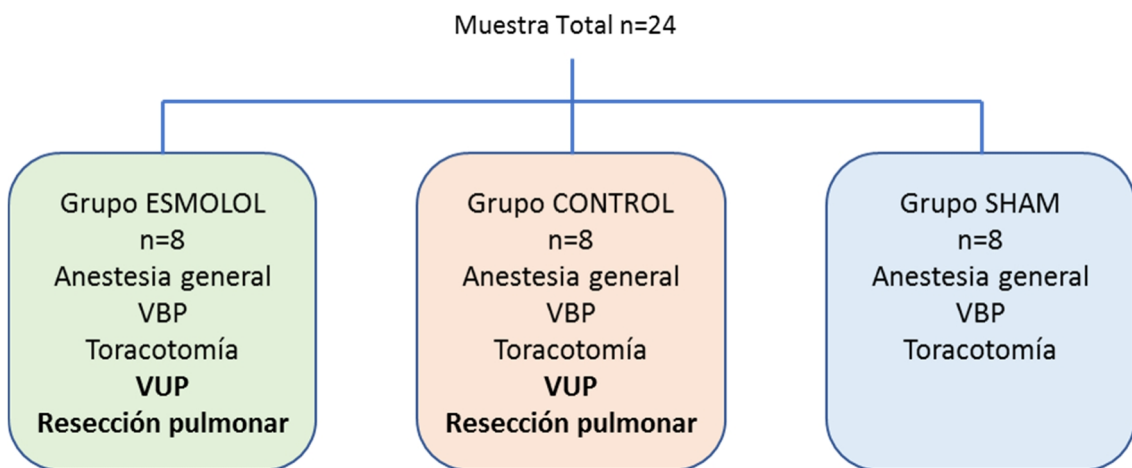


Fig 11: Distribución de los grupos experimentales. VBP: Ventilación bipulmonar. VUP: Ventilación unipulmonar.

2. Procedimiento anestésico

Antes de la intervención se administró ketamina (Ketolar, Parke Davis, Pfizer, Dublin, Ireland) por vía intramuscular a los sujetos como premedicación, a dosis de 10 mg/kg de peso. Los animales pudieron beber agua libremente hasta el momento de la intervención, pero no se permitió la ingesta de comida sólida en las 18 horas anteriores al inicio de la cirugía. Se colocó a los animales en decúbito supino sobre la mesa de operaciones, se les monitorizó mediante pulsioximetría y electrocardiografía y se canalizó una vía venosa periférica en la oreja izquierda. Se preoxigenó a los animales administrando oxígeno con mascarilla facial con una fracción inspirada de oxígeno (FiO₂) de 1 durante 2 minutos antes de la inducción anestésica.

Como inducción anestésica se administró de forma secuencial por vía intravenosa fentanilo (Fentanest, Kern Pharmaceuticals, Houston, TX) a dosis de 3 mcg/kg, propofol (Diprivan, AstraZeneca, Macclesfield, Cheshire, UK) a dosis de 3mg/kg, y atracurio (Tracrium, GlaxoSmithKline, Brentford, UK) a dosis de 0,6mg/kg. El mantenimiento anestésico se realizó con una perfusión continua de propofol a dosis de 10mg/kg/h durante todo el proceso quirúrgico. Se administraron bolos adicionales de fentanilo y atracurio durante el procedimiento, según el criterio del anestesiólogo guiado por datos clínicos y hemodinámicos, de forma que se garantice la correcta analgesia del animal durante el procedimiento, así como su relajación neuromuscular, facilitando la intervención quirúrgica. Se administró fluidoterapia de mantenimiento con una solución intravenosa de Plasmalyte (Baxter AG, Luxemburgo) a dosis de 5 ml/kg/h.

Tras realizar la inducción anestésica se procedió a la intubación endotraqueal de los sujetos mediante laringoscopia directa con un laringoscopio de tipo Miller y un tubo endotraqueal con balón de pneumotaponamiento del número 6-7 según el tamaño del animal. Se utilizaron pinzas de Magill para dirigir el tubo endotraqueal a la glotis.



Fig 12: Material para el manejo de la vía aérea. Arriba izquierda: Tubo endotraqueal con balón. Arriba derecha: Laringoscopio de pala recta tipo Miller. Abajo: Pinzas de Magill.

Se inició la ventilación mecánica bipulmonar mediante un respirador modelo Dräger SA 1 (Dräger Medical Hispania, Madrid, España). Se comprobó el correcto posicionamiento del tubo endotraqueal mediante auscultación torácica bilateral y objetivándose medición de capnografía correcta. Se utilizó una estrategia de ventilación de protección pulmonar controlada por volumen, con un volumen corriente de 8 ml/kg y 12 respiraciones por minuto, relación entre inspiración y espiración de 1:2 y una presión positiva al final de la inspiración (PEEP por sus siglas en inglés) de 5 cmH₂O. La FiO₂ administrada fue de 0,6 durante todo el transcurso de la cirugía. Durante la ventilación unipulmonar se continuó la estrategia de ventilación protectora utilizando un volumen corriente de 6 ml/kg.

La monitorización durante la cirugía consistió en electrocardiografía de 6 derivaciones, pulsioximetría, capnografía, presión arterial invasiva y presión venosa central. Para estas últimas dos mediciones se cateterizaron la arteria y vena femorales, mediante disección quirúrgica de la ingle derecha de los animales de experimentación hasta aislar los vasos e introducir sendos catéteres vasculares de 7 Fr (Arrow-Howes) por el método de Seldinger.



Fig 13: Izquierda: Colocación en la mesa quirúrgica para canalización de vías. Derecha: Ingle disecada con vasos canalizados.

Se utilizó el monitor PiCCO (Pulse Contour Cardiac Output) (PULSION Medical Systems AG, Munich, Alemania) para medir y registrar los datos hemodinámicos. El sistema PiCCO es un sistema de monitorización hemodinámica por termodilución transpulmonar (TDTP). La TDTP es un método de dilución empleado para medir el gasto cardiaco mediante la administración de un indicador, en este caso suero salino a una temperatura próxima a la congelación. Se administra el suero por la vena femoral y se mide el cambio de temperatura ocasionado en la sangre a nivel de la arteria femoral, tras el paso del indicador por la circulación derecha y el corazón izquierdo. Se basa en la premisa de que el gasto cardiaco es inversamente proporcional al cambio de concentración del indicador en un período de tiempo determinado. De este modo, y tras la administración del indicador, se genera una curva temperatura-tiempo donde el área bajo la curva es inversamente proporcional al gasto cardiaco.¹⁸⁸

Adicionalmente se usó un analizador de gases GEM Premiere 5000 para analizar muestras de sangre arterial a pie de cama, monitorizándose de esta forma la adecuada ventilación y

oxigenación de los animales durante todo el procedimiento, pudiéndose analizar pH, presión arterial de oxígeno (paO₂) y presión arterial de CO₂ (paCO₂).



Fig 14: Izquierda: Monitor PiCCO. Derecha: Analizador de gases GEM Premiere 5000

La profilaxis antibiótica se realizó con una dosis intramuscular de penicilina benzatina (600.000 UI IM) antes de la intervención quirúrgica.

Tras la apertura de la pleura, en todos los grupos salvo el SHAM, se inició la ventilación unipulmonar progresando el tubo endotraqueal al bronquio principal derecho bajo la guía con visión directa de un fibrobroncoscopio (fibrobroncoscopio flexible Olympus), manteniendo los mismos parámetros de ventilación protectora descritos anteriormente, durante 120 minutos. Posteriormente se recolocó el tubo endotraqueal en tráquea restableciendo la ventilación bipulmonar durante 60 minutos.

Al finalizar la cirugía se realizó la educación anestésica, interrumpiendo la administración de propofol. Tras constatar la adecuada mecánica respiratoria espontánea se procedió a extubar al animal y se transportó a una jaula adecuada. Durante las siguientes 24 horas se administró ketorolaco (Droal, Vita S.A., La Paz, Bolivia.) intramuscular para el control del dolor y se permitió acceso libre al agua.

Pasado este tiempo se realizó una nueva anestesia general con idéntico protocolo de inducción y mantenimiento que la anterior, siendo igual para los tres grupos experimentales. Se tomaron biopsias de tejido hepático mediante la realización de laparotomía media subxifoidea a los sujetos de estudio, y posteriormente se procedió al sacrificio del animal, profundizando su hipnosis con un bolo de 2mg/kg de propofol, y posteriormente administrándose en bolo 40mEq de cloruro potásico por vía intravenosa para producir la parada cardíaca.

3. Procedimiento quirúrgico

El procedimiento es realizado por un Especialista en Cirugía Torácica.

Tras la inducción anestésica los cerdos fueron colocados en posición de decúbito lateral derecho. Se desinfectó el campo quirúrgico con povidona yodada. Se delimitó el campo quirúrgico mediante sábanas quirúrgicas estériles. Mediante técnica quirúrgica aséptica se realizó una incisión de toracotomía izquierda, colocándose un separador costal para exponer el campo quirúrgico.

En los grupos CONTROL y ESMOLOL se realizó disección del parénquima pulmonar por debajo de la cisura interlobar, ligando arteria, vena y bronquio lobar caudal. Se resecó el lóbulo caudal izquierdo, extrayéndose la pieza quirúrgica. Se realizó hemostasia y aerostasia cuidadosas, comprobándose la ausencia de fugas. Se dejó en la cavidad torácica un tubo de drenaje intrapleural, suturado a la piel. Se conectó el tubo a un sistema de flujo unidireccional (válvula de Heimlich). Finalmente se realizó el cierre quirúrgico por planos, cerrándose la pleura, la capa muscular y la piel con suturas quirúrgicas.

Desde el momento inmediatamente anterior a la apertura de la pleura pulmonar por parte del cirujano hasta el fin de la resección pulmonar se realizó ventilación unipulmonar en los grupos ESMOLOL y CONTROL.

En el grupo SHAM tras la incisión de toracotomía se mantuvo ventilación bipulmonar, no realizándose por tanto en ningún momento VUP ni resección del parénquima pulmonar, suturándose la herida de toracotomía al finalizar el procedimiento.

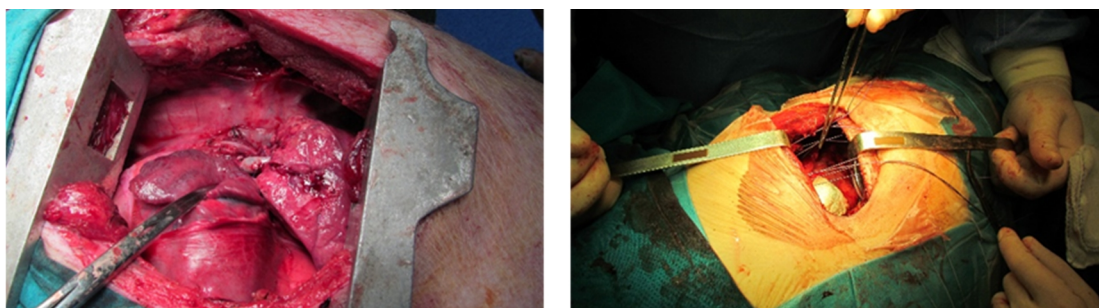


Fig 15 Detalle de la cirugía de resección pulmonar. Izquierda: Tórax abierto con exposición del hilio pulmonar.
Derecha: Cierre por planos de la incisión de toracotomía.

4. Recogida de datos y obtención de muestras.

4.1 Gasometrías arteriales.

Durante el procedimiento se extrajeron muestras para gasometría arterial utilizando una jeringa heparinizada para gasometría del catéter arterial femoral en 5 momentos diferentes: Tras la inducción anestésica, a los 30 minutos de VUP, a los 120 minutos de VUP, tras 60 minutos de VBP y tras la segunda inducción anestésica 24 horas tras la primera cirugía. Estas muestras de sangre arterial se analizaron a pie de cama utilizando el mencionado analizador de gases GEM Premiere 5000. Se registraron los siguientes parámetros: pH, presión arterial de oxígeno (paO₂), presión arterial de CO₂ (paCO₂) y SpO₂.

4.2 Parámetros hemodinámicos y respiratorios.

Se registraron las mediciones de diferentes parámetros hemodinámicos y respiratorios en el mismo momento en que se obtuvieron las muestras de sangre a analizar. Utilizando el dispositivo PiCCO se realizaron tres termodiluciones transpulmonares administrando suero salino frío por la vía venosa central. Se registraron los parámetros hemodinámicos correspondientes a la media de las tres mediciones. Los parámetros hemodinámicos que se registraron son frecuencia cardiaca (FC); presión arterial media (PAM); presión venosa central (PVC); índice cardiaco (IC); índice de volumen global al final de la diástole (GEDI); índice de contractilidad del ventrículo izquierdo (DPmax); y variación de volumen sistólico (VVS).

Desde el punto de vista respiratorio, además de las variables gasométricas, se registraron la presión pico en las vías aéreas (PPaw) medido por el respirador y la saturación periférica de oxígeno (SpO₂).

4.3 Muestras de suero

Se extrajeron muestras sanguíneas de 5ml de la vía venosa central en cuatro momentos diferentes: Tras la inducción anestésica, a los 120 minutos de VUP, tras 60 minutos de VBP y tras la segunda inducción anestésica a las 24 horas. Estas muestras fueron centrifugadas y posteriormente se pipeteó el suero sobrenadante, conservándolo en un recipiente a -40°C. En estas muestras de suero se determinaron niveles de TNF- α , IL-1, Syndecan, óxido nitroso y catepsina.

4.4 Biopsias hepáticas.

24 horas tras la finalización de la cirugía se obtuvo una biopsia hepática de cada animal bajo anestesia general. Estas muestras se introdujeron en un criotubo y se congelaron mediante

nitrógeno líquido a -80°C. Se determinaron los niveles de marcadores de inflamación, apoptosis y daño al glicocálix. Los marcadores analizados son MCP-1, NFκB, IL-1, IL-10, TNF-α, eNOS, iNOS, Bcl2, BAX, PUMA, BAD y BAK.

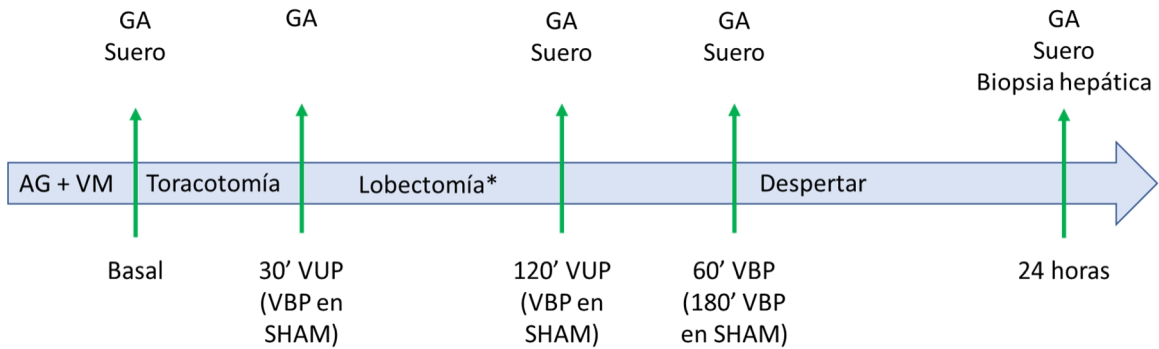


Fig 16: Toma de muestras. AG: Anestesia general. VM: Ventilación mecánica. VUP: Ventilación unipulmonar. VBP: Ventilación bipulmonar. * Solo se realiza lobectomía en grupos ESMOLOL y CONTROL.

5. Análisis bioquímico:

Niveles de TNF e IL-1 en suero: Se utilizó ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay) para su medición, utilizando Kits de ELISA comerciales específicos para cerdos (Cusabio Biotech Co Ltd, China).

Brevemente, las muestras se pipetearon en pocillos revestidos con un anticuerpo monoclonal específico para la citoquina a cuantificar. Posteriormente se realizó un lavado, eliminando las sustancias no unidas a los anticuerpos que pudiesen interferir con la medición. Seguidamente se añadió un segundo anticuerpo específico para el primero conjugado con biotina y se realizó una segunda incubación. Se realizó un nuevo lavado, eliminando el segundo anticuerpo no unido. Se incubaron nuevamente en presencia de un complejo estreptavidina-peroxidasa, que se unió a su vez a la biotina del segundo anticuerpo. Nuevamente se realizó un lavado, eliminando la enzima no unida, y se añadió una solución sustrato que produce un

cambio de color mediante una reacción enzimática. El proceso se detuvo tras 1 min, midiéndose el cambio de color mediante un espectrofotómetro.

Expresión de proteínas: Se utilizó la técnica de Western Blotting para medir la expresión de TNF, IL-1, Syndecan y catepsina en suero; así como la expresión de TNF, IL-1, IL-10, Nf-KB, MCP1, eNOS, iNOS, Bcl-2, BAX, PUMA, BAD, BAK y Syndecan en biopsias hepáticas.

Las muestras se homogeneizaron en tampón de lisis (100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L TRIS-Cl (pH 7,6) 1 mmol/L EDTA (pH 8), 1 mg/ml aprotinina, 100 µg/ml PMSF). Posteriormente se diluyó la muestra en un ratio 1:1 con tampón 2X (100 mmol/L TRIS-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 20% glicerol, 0.1 azul de bromofenol, 200 mmol/L ditiotretol) y se hivió durante 10 minutos a 100°C.

Se determinó la concentración de proteínas utilizando la prueba del ácido bicinónico o ensayo de Smith.¹⁸⁹ Utilizando electroforesis en gel con sodio dodecil sulfato-poliacrilamida (acrilamida 20%), se separaron cantidades equivalentes de proteínas (25 µg) de cada muestra, transfiriéndose a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) usando un sistema semiseco. Esta membrana se incubó 60 minutos a 37°C en un tampón bloqueante (20 mmol/L TRIS, 150 mmol/L NaCl, 0,2% Noninet P 40, 5% leche desnatada), para evitar la unión inespecífica. A continuación, se incubó con anticuerpos de conejo específicos para las proteínas a cuantificar. Tras realizar un lavado eliminando el anticuerpo no unido se incubó nuevamente la membrana en presencia de un anticuerpo secundario para inmunoglobulinas de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase-conjugated polyclonal anti-rabbit IgG secondary antibody, Transduction Lab, Lexington, KY). Se realizó un nuevo lavado y se incubó la membrana con reactivos ECL Plus (Amersham Life Science Inc., Buckinghamshire, UK). Se expuso la membrana a rayos-x. Con un densitómetro (BioRad GS 800) se escaneó la placa, se digitalizó y se determinaron las densidades ópticas relativas. Los pesos moleculares se

determinaron utilizando marcadores proteicos preteñidos y se analizaron las bandas de proteínas.

Expresión de ARN mensajero: Se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para medir la expresión de ARNm de TNF, IL-1, IL-10, Nf-KB, MCP1, eNOS e iNOS en biopsias hepáticas. Esta técnica consiste en la retrotranscripción del ARNm a ADN y la posterior amplificación de dicho ADN para su cuantificación.

Se aisló el ARNm de las muestras de hígado utilizando el kit TRI reactivo (Molecular Research Centre, Inc, Cincinnati, OH, USA), utilizando el método descrito por Chomczynski y Sacchi.¹⁹⁰ Se midió la pureza del ARNm mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%, determinándose las concentraciones de éste con espectrofotometría.

La transcripción inversa se realizó con un kit comercial (Promega, Madison, WI, USA) y una mezcla de primers o cebadores pd(N)6, utilizándose 2µg de ARNm por cada muestra. Los primers o cebadores son dos secuencias cortas de nucleótidos complementarias cada una a una de las dos hebras de ADN que delimitan las zonas de la hebra a amplificar y permiten que la polimerasa inicie la reacción. Se utilizó un termociclador para PCR en tiempo real (Applied Biosystems 7300). Se utilizó el método inespecífico de fluorescencia SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). Los primers se utilizaron a 300nM de concentración. En la tabla inferior se muestra la secuencia de primers utilizados. Se utilizó el gen 18S como control interno. Los cambios en la expresión del mRNA se analizaron con un método de cuantificación relativa, comparando los cambios de la expresión del gen a analizar con el mencionado control, según el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$.¹⁹¹ El cADN obtenido se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Primer	Sentido	Antisentido
18S	GGTGCATGGCCGTTCTTA	TCGTTTCGTTATCGGAATTAACC
TNF α	ATGAGAAGTTCCCAAATGGC	CTCCACTTGGTGGTTTGCTA
IL-1	TGTGATGAAAGACGGCACAC	CTTCTTCTTTGGGTATTGTTGG
IL-10	ACTGCACCCACTTCCCAGT	TTGTCCAGCTGGTCCTTTGT
NF κ B	CAGCTCTTCTCAAAGCAGCA	TCCAGGTCATAGAGAGGCTCA
MCP-1	AGCATCCACGTGCTGTCTC	GATCATCTTGCCAGTGAATGAGT
eNOS	CCAGTGCCCTGCTTCATC	GCAGGGCAAGTTAGGATCAG
iNOS	CTTTGCCACGGACGAGAC	TCATTGTA CTCTGAGGGCTGAC

Tabla 3: Primers para PCR.

Nivel de óxido nítrico en suero: Para determinar la concentración de óxido nítrico en suero se usó la reacción de Griess. Para ello se hizo reaccionar a la muestra con el reactivo de Griess, una solución ácida conteniendo un derivado de la anilina, sulfanilamida, y un agente de acoplamiento, N-(1-naftil) etilendiamina.

Al añadir el reactivo, el ion nitrito reaccionó con la sulfanilamida formando una sal de diazonio. Ésta reaccionó posteriormente con N-(1-naftil) etilendiamina dando lugar a un tinte rojizo. Posteriormente, se analizó utilizando un espectrofotómetro para cuantificar la concentración.

6. Estudio estadístico:

Se comparan los parámetros hemodinámicos y respiratorios, así como los marcadores de inflamación, de daño endotelial y de apoptosis entre los tres grupos, CONTROL, ESMOLOL y SHAM.

Los análisis post-hoc se realizaron con la corrección de Bonferroni. Se realizó análisis covariante para analizar los efectos entre grupos a las 24h de la cirugía en las muestras de

biopsia hepática, así como en las muestras de suero cuando se ajustaba por valores basales. Para detectar diferencias en datos hemodinámicos y ventilatorios, se usó el test ANOVA multifactorial de medidas repetidas para comparar los efectos del esmolol a lo largo del estudio. El factor era el grupo al que pertenecían los animales (CONTROL, ESMOLOL o SHAM) y las medidas repetidas se realizaban en cada fase del estudio (basal, 30 minutos de VUP, 120 minutos de VUP, 60 minutos de VBP y 24h tras cirugía). La evolución de estos parámetros y su interacción con él también se analizaron con un ANOVA multifactorial de medidas repetidas. Por lo tanto, los valores p se ajustaron en comparaciones transversales y longitudinales con el método Bonferroni.

El análisis de resultados se realizó con el paquete estadístico SPSS para Windows (versión 22.0; IBM Corp, Armonk, NY). Todos los test utilizados eran pruebas de dos colas y una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

Resultados

1. Parámetros Hemodinámicos y Gasométricos

La FC aumentó ligeramente en los momentos iniciales de la cirugía en los tres grupos para estabilizarse posteriormente. La PAM se modificó mínimamente durante el procedimiento en los tres grupos. Comparativamente entre los grupos, estas variaciones hemodinámicas en FC y PAM no fueron estadísticamente significativas. (Gráficas 1 y 2 y Tabla 4)

La PVC también se mantuvo constante a lo largo del procedimiento en los tres grupos. En el grupo Control observamos valores menores si bien la diferencia fue significativa únicamente en una de las mediciones, la realizada tras 30 minutos de ventilación bipulmonar, hacia el final de la intervención. (Gráfica 3 y Tabla 4)

En cuanto al IC, se observa que el grupo de Esmolol parte desde un índice menor previo a la intervención. Sin embargo, durante el procedimiento los valores se mantienen dentro de la normalidad y constantes. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. (Gráfica 4 y Tabla 4)

El GEDI experimenta un cierto aumento en los grupos Control y Esmolol durante la cirugía de resección pulmonar, manteniéndose estable durante el procedimiento en el grupo Sham. Las diferencias, no obstante, no fueron significativas entre los grupos. (Gráfica 5 y Tabla 4)

El Dpmax fue discretamente menor en el grupo Esmolol al inicio. Los tres grupos experimentaron un ligero ascenso a lo largo de la prueba, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre ellos. (Gráfica 6 y Tabla 4)

En la VVS el grupo Control se encuentra con valores en el límite alto de la normalidad desde el inicio de la cirugía, manteniéndose estables durante su transcurso. Los grupos Esmolol y Sham partieron de valores menores que también ascendieron hacia el límite alto de la normalidad. Los valores del grupo Control fueron significativamente mayores en las primeras dos mediciones, posteriormente no se existieron diferencias significativas. (Gráfica 7 y Tabla 4)

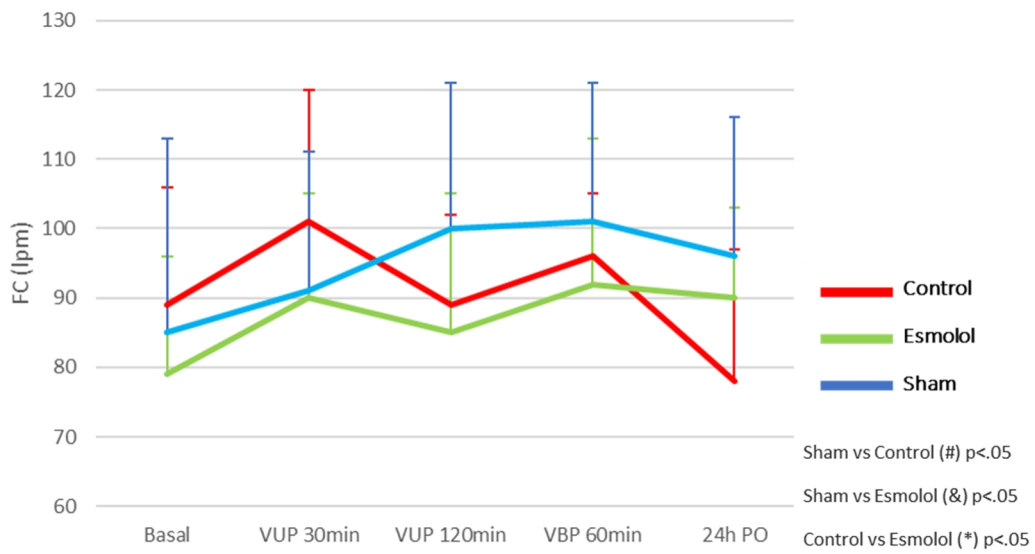
		Basal	VUP 30min	VUP 120min	VBP 60min	24h PO
FC (lpm)	Control	89 (17)	101 (19)	89 (13)	96 (9)	78 (19)
	Esmolol	79 (17)	90 (15)	85 (20)	92 (21)	90 (13)
	Sham	85 (28)	91 (20)	100 (21)	101 (20)	96 (20)
PAM (mmHg)	Control	100 (27)	105 (21)	105 (17)	124 (14)	100 (14)
	Esmolol	94 (15)	105 (12)	110 (19)	138 (21)	117 (34)
	Sham	112 (14)	102 (24)	117 (17)	129 (7)	121 (7)
PVC (mmHg)	Control	8,3 (5)	9,3 (4,1)	9,1 (5,1)	8,1 (4,9)	8,8 (4,3)
	Esmolol	10,9 (3,9)	12,1 (3,1)	12 (3,8)	12,1 (3,2)	11 (3,3)
	Sham	12 (3,5)	12,8 (2,8)	12,2 (2,6)	12,4 (3,6)	10,3 (2,8)
IC (l/min/m ²)	Control	3,7 (0,8)	4,1 (1,5)	3,6 (0,9)	4,4 (1,5)	2,9 (0,8)
	Esmolol	2,7 (1) c	3 (1,6)	3,3 (2)	3,4 (1,6)	2,9 (0,7)
	Sham	3,1 (1,1)	2,7 (0,7)	2,9 (0,8)	3,5 (1,5)	4,6 (2,5)
GEDI (ml/m ²)	Control	591 (236)	643 (280)	641 (302)	711 (228)	480 (197)
	Esmolol	560 (332)	591 (409)	635 (461)	716 (334)	677 (337)
	Sham	463 (140)	446 (123)	417 (101)	438 (197)	434 (329)
Dpmax (mmHg/s)	Control	723 (207)	684 (208)	834 (219)	909 (295)	764 (228)
	Esmolol	573 (60)	709 (163)	780 (213)	711 (153)	756 (278)
	Sham	705 (446)	1087 (643)	943 (564)	876 (442)	928 (287)
VVS (%)	Control	16 (5,5) a, c	15 (6,5) a, c	14 (3,5)	15 (5,3)	17 (7)
	Esmolol	9 (4,1)	7 (3,4)	9 (4,3)	19 (10,3)	14 (4,7)
	Sham	12 (4,6)	6 (2,9)	11 (3,5)	15 (7,9)	9 (1,9)

Tabla 4: Valores hemodinámicos. Datos expresados como media (desviación estándar). VUP: Ventilación unipulmonar; VBP: Ventilación bipulmonar. FC: Frecuencia cardíaca; PAM: Presión arterial media; PVC: Presión venosa central; IC: Índice cardíaco; GEDI: volumen global al final de la diástole; Dpmax: índice de contractilidad del ventrículo izquierdo; VVS: Variación de volumen sistólico.

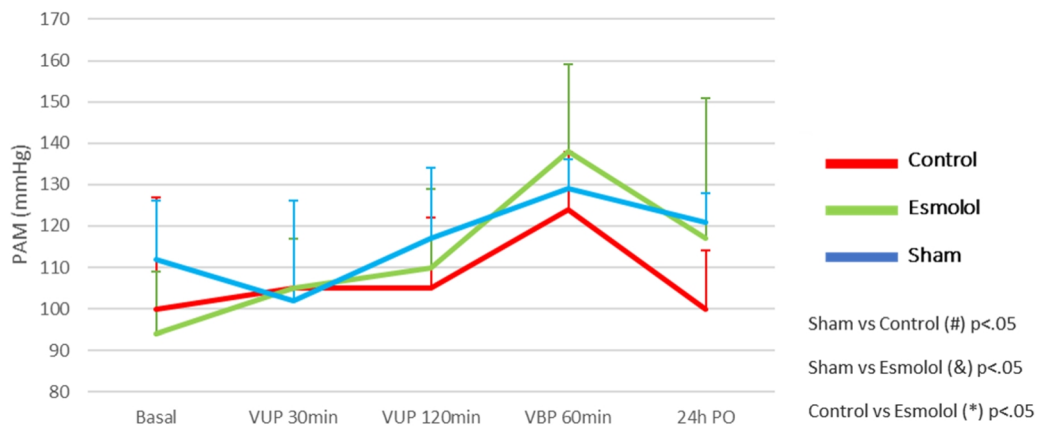
a: $p < 0.05$ Sham vs Control

b: $p < 0.05$ Sham vs Esmolol

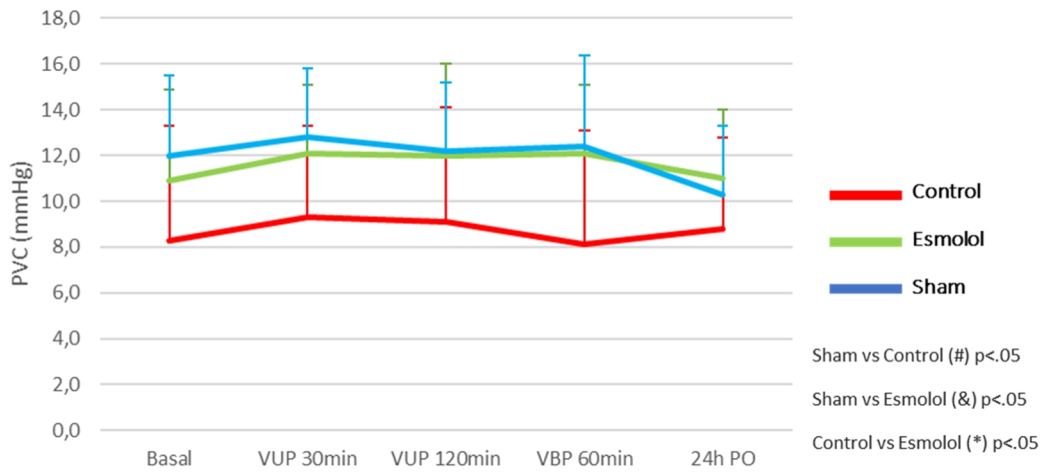
c: $p < 0.05$ Control vs Esmolol



Gráfica 1: Frecuencia cardíaca. FC: Frecuencia cardíaca. Lpm: Latidos por minuto. VUP: Ventilación unipulmonar. VBP: Ventilación bipulmonar. PO: Postoperatorio.

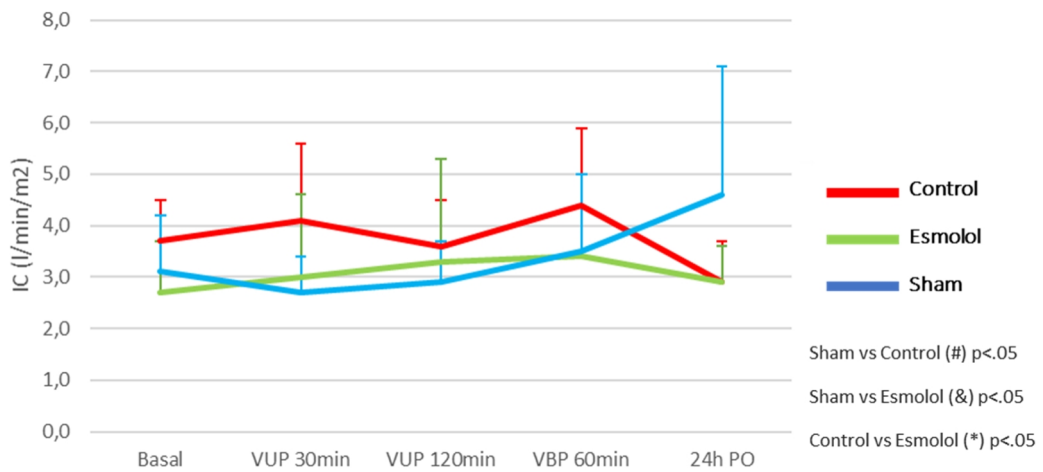


Gráfica 2: Presión arterial media. PAM: Presión arterial media. VUP: Ventilación unipulmonar. VBP: Ventilación bipulmonar. PO: Postoperatorio.



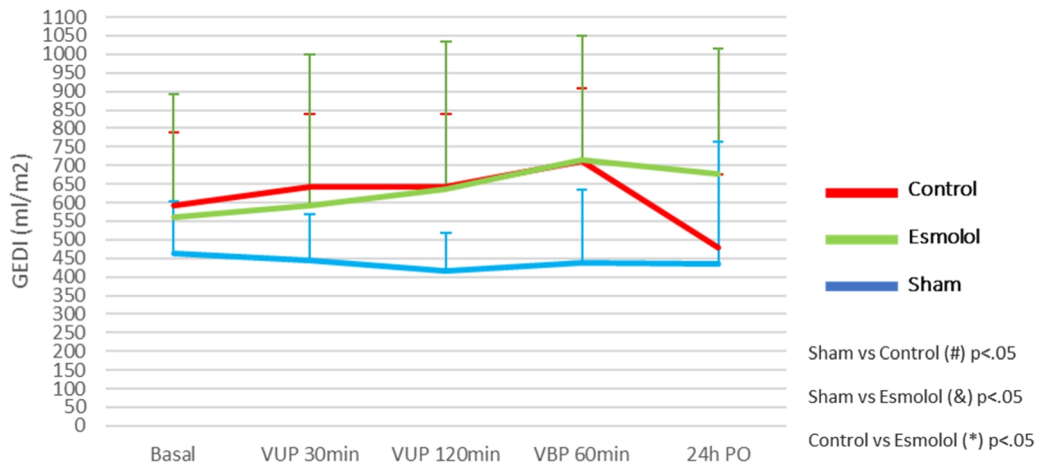
Gráfica 3: Presión venosa central. PVC: Presión venosa central. VUP: Ventilación unipulmonar. VBP:

Ventilación bipulmonar. PO: Postoperatorio.



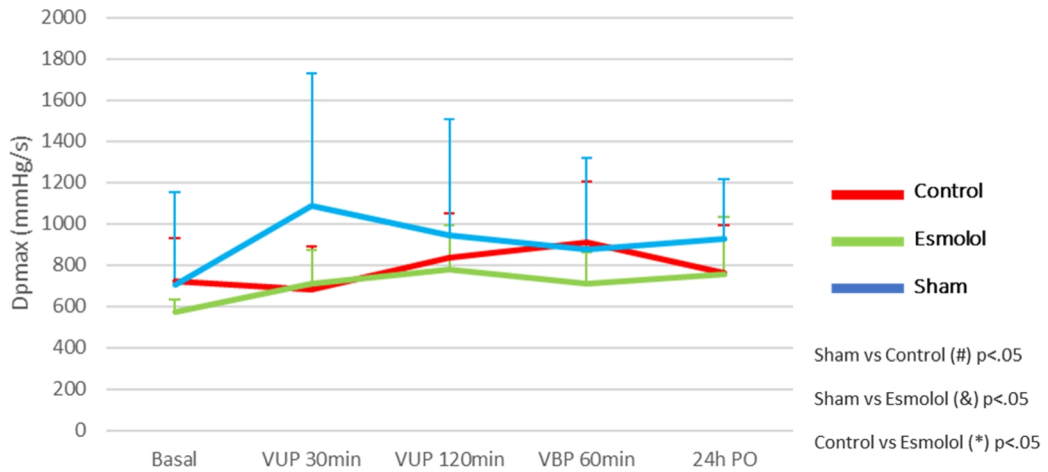
Gráfica 4: Índice cardiaco. IC: Índice cardiaco. VUP: Ventilación unipulmonar. VBP: Ventilación bipulmonar. PO:

Postoperatorio.



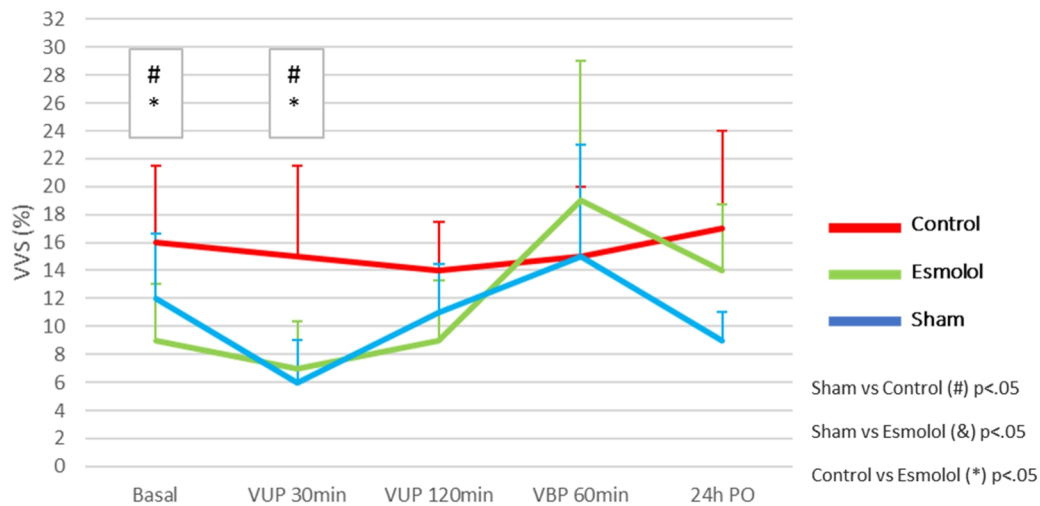
Gráfica 5: GEDI. GEDI: Global End Diastolic Index (índice de volumen global al final de la diástole). VUP:

Ventilación unipulmonar. VBP: Ventilación bipulmonar. PO: Postoperatorio.



Gráfica 6: Dpmax. Dpmax: Índice de contractilidad del ventrículo izquierdo. VUP: Ventilación unipulmonar.

VBP: Ventilación bipulmonar. PO: Postoperatorio.



Gráfica 7: VVS. VVS: Variación de Volumen Sistólico. VUP: Ventilación unipulmonar. VBP: Ventilación bipulmonar. PO: Postoperatorio.

La oxigenación arterial descendió durante la VUP tanto en el grupo Control como en el grupo de Esmolol para recuperar valores basales al final de la cirugía, durante la ventilación bipulmonar y en la medición postoperatoria. En el grupo Sham no se registraron variaciones a lo largo de todo el procedimiento ni en el postoperatorio. (Tabla 5)

El pH tiende a acidificarse durante el procedimiento en los tres grupos para recuperarse en la medición postoperatoria a valores iniciales. (Tabla 5)

La PPaw aumentó en los grupos Control y Esmolol durante la VUP, manteniéndose estable en el grupo Sham, que no fue sometido a VUP. (Tabla 5)

La SpO2 fue discretamente menor en los grupos Control y Esmolol que en el Sham, que no fue sometido a ventilación unipulmonar, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. La variación del pH tendente a la acidosis es algo más acentuada en el grupo Sham, si bien no resulta estadísticamente significativo. La diferencia en la PPaw fue significativa estadísticamente en el periodo de VUP entre el grupo Sham y los otros dos. El resto de las variables gasométricas no registraron diferencias significativas entre los grupos en ningún punto del procedimiento ni en el postoperatorio. (Tabla 5)

		Basal	VUP 30'	VUP 120'	VBP 60'	24h PO
SpO2 (%)	Control	100 (0)	98 (2)	99 (1)	97 (5)	100 (0)
	Esmolol	100 (0)	97 (3)	99 (1)	99 (1)	100 (0)
	Sham	100 (0)	100 (0)	100 (0)	100 (0)	100 (0)
PaO2 (mmHg)	Control	258 (60)	131 (29)	162 (31)	199 (93)	251 (81)
	Esmolol	241 (120)	117 (53)	167 (70)	195 (114)	263 (134)
	Sham	260 (115)	280 (71) a,b	257 (59) a,b	275 (81)	257 (44)
PaCO2 (mmHg)	Control	40 (8)	41,2 (8)	43,4 (7)	48 (10)	46,3 (7)
	Esmolol	42,8 (9)	48,6 (7)	49,3 (7)	51,1 (7)	46,3 (7)
	Sham	36,7 (4)	43 (9)	52,3 (7)	53,6 (6)	48 (10)
pH	Control	7,48 (0,07)	7,45 (0,06)	7,43 (0,08)	7,37 (0,1)	7,53 (0,07)
	Esmolol	7,43 (0,13)	7,42 (0,06)	7,41 (0,07)	7,39 (0,07)	7,49 (0,13)
	Sham	7,41 (0,11)	7,35 (0,15)	7,32 (0,13)	7,35 (0,03)	7,45 (0,06)
PPaw (cmH2O)	Control	27,3 (3,1)	35,1 (7,1)	35,2 (6,8)	31,6 (7,2)	32,7 (7,3)
	Esmolol	28,2 (3,6)	35,3 (6,6)	34,9 (7,4)	31,8 (6,8)	32,4 (6,7)
	Sham	28,6 (3,3)	28,9 (2,8) a,b	29,2 (4,4) a,b	31,1 (5,1)	31,3 (5,3)

Tabla 5: Valores gasométricos. Datos expresados como media (desviación estándar). VUP: Ventilación unipulmonar; VBP: Ventilación bipulmonar. SpO2: Saturación periférica de oxígeno; PaO2: Presión arterial de oxígeno; PaCO2: Presión arterial de dióxido de carbono; PPaw: Presión pico en la vía aérea.

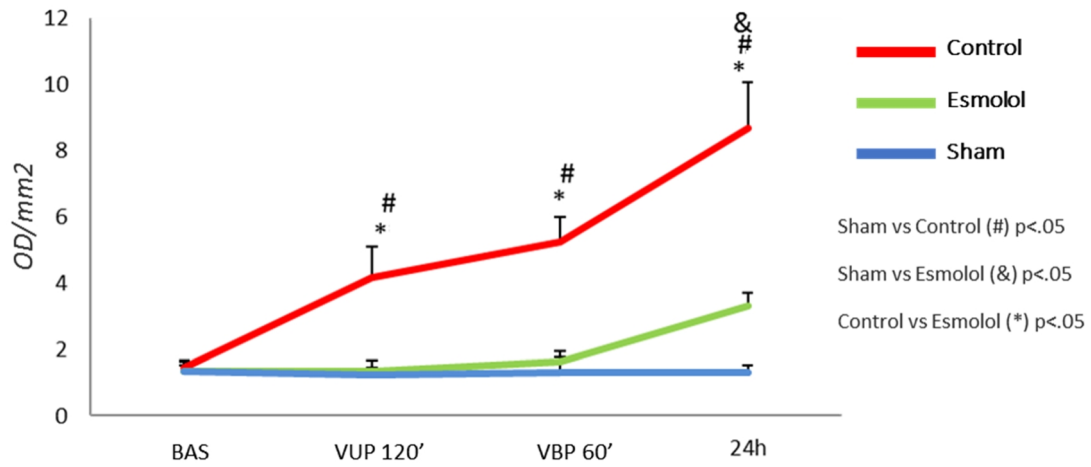
a: $p < 0.05$ Sham vs Control

b: $p < 0.05$ Sham vs Esmolol

c: $p < 0.05$ Control vs Esmolol

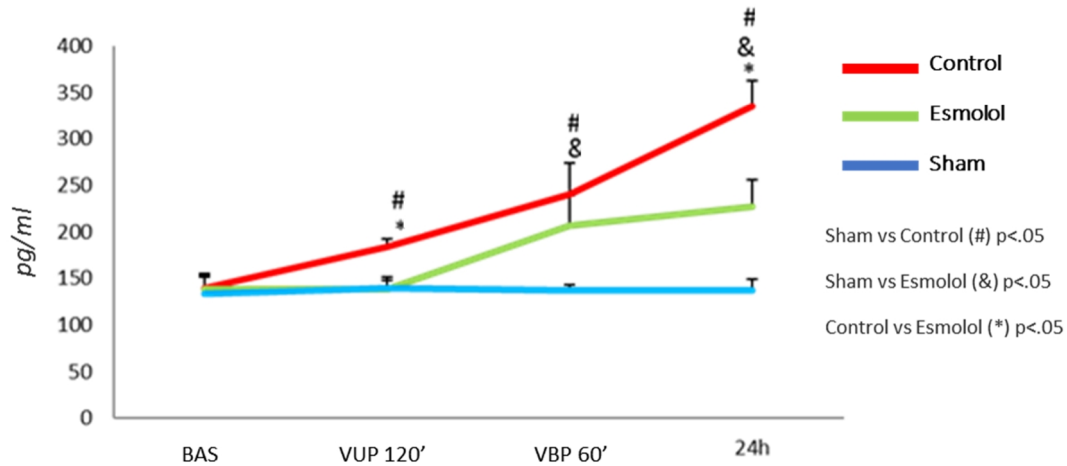
2. Biomarcadores en Suero

TNF α



	Basal	VUP120'	VBP60'	24h	
TNF WB (OD/mm ²)	Control	1,43 (0,23)	4,18 (0,9)	5,25 (0,75)	8,68 (1,37)
	Esmolol	1,33 (0,28)	1,33 (0,34)	1,61 (0,35)	3,32 (0,39)
	Sham	1,33 (0,17)	1,22 (0,21)	1,32 (0,44)	1,32 (0,21)
	ANOVA	0,676	0,011 #, *	0,008 #, *	0,003 #, &, *

Gráfica 8: TNF en suero medido por Western Blot. Datos expresados como media (desviación estándar). VUP: Ventilación unipulmonar; VBP: Ventilación bipulmonar.
 Sham vs Control (#) $p < .05$
 Sham vs Esmolol (&) $p < .05$
 Control vs Esmolol (*) $p < .05$

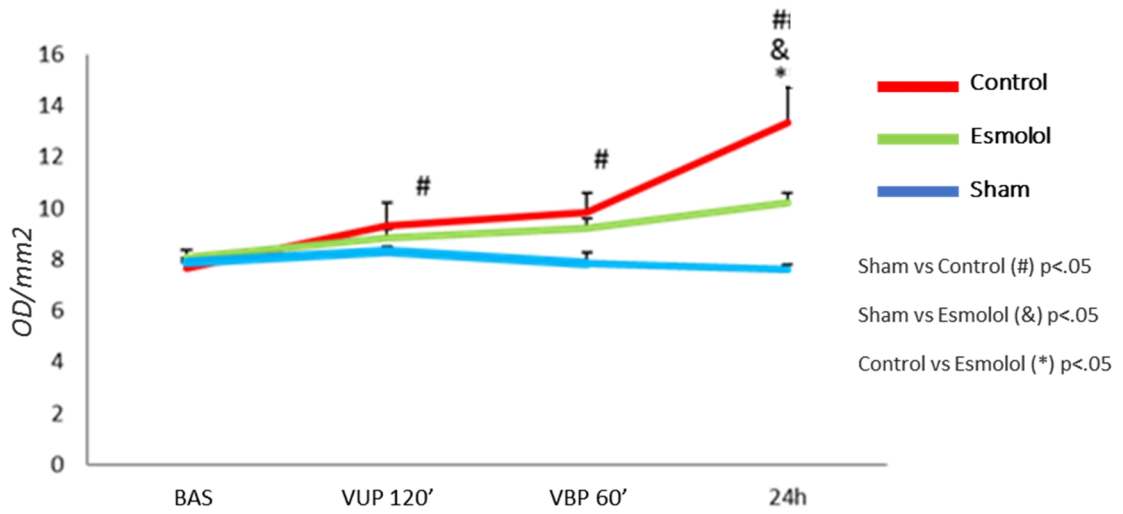


	Basal	VUP120'	VBP60'	24h
TNF ELISA (pg/ml)				
Control	39,6 (22,8)	81,8 (26,6)	106,4 (33,5)	144,1 (43,8)
Esmolol	38 (3,7)	40,5 (1,1)	57,6 (6,4)	84,5 (8,9)
Sham	38,7 (8,3)	40,7 (2,3)	39,1 (3,8)	40,1 (12,1)
ANOVA	0,7	0,003 #, *	0,001 #, &	0,001 #, &, *

Gráfica 9: TNF en suero medido por ELISA. Datos expresados como media (desviación estándar). VUP: Ventilación unipulmonar; VBP: Ventilación bipulmonar.
 Sham vs Control (#) p<.05
 Sham vs Esmolol (&) p<.05
 Control vs Esmolol (*) p<.05

El TNF α en suero aumenta progresivamente en los grupos Esmolol y Control a lo largo del procedimiento, manteniéndose estable en el grupo Sham. En grupo Esmolol presenta inicialmente resultados similares al Sham, sufriendo un aumento más marcado al final de la cirugía y tras 24h. El aumento experimentado por el grupo Control fue significativamente superior al Esmolol. También hubo diferencias significativas entre el grupo Esmolol y el Sham en las medidas tras 60' de VBP y tras 24h en ELISA, no así en las medidas basal y tras 120' de VUP, ni en la medida tras 60' de VBP en Western Blot. (Gráficas 8 y 9)

IL-1



		Basal	VUP120'	VBP60'	24h
IL-1 WB (OD/mm ²)	Control	7,7 (1,1)	9,3 (0,6)	9,8 (0,8)	13,3 (1,7)
	Esmolol	8,1 (0,5)	8,8 (1,6)	9,2 (0,5)	10,2 (0,4)
	Sham	7,9 (1,1)	8,3 (0,4)	7,8 (1,5)	7,6 (1,8)
	ANOVA	0,763	0,09 #	0,085 #	0,002 #,&, *

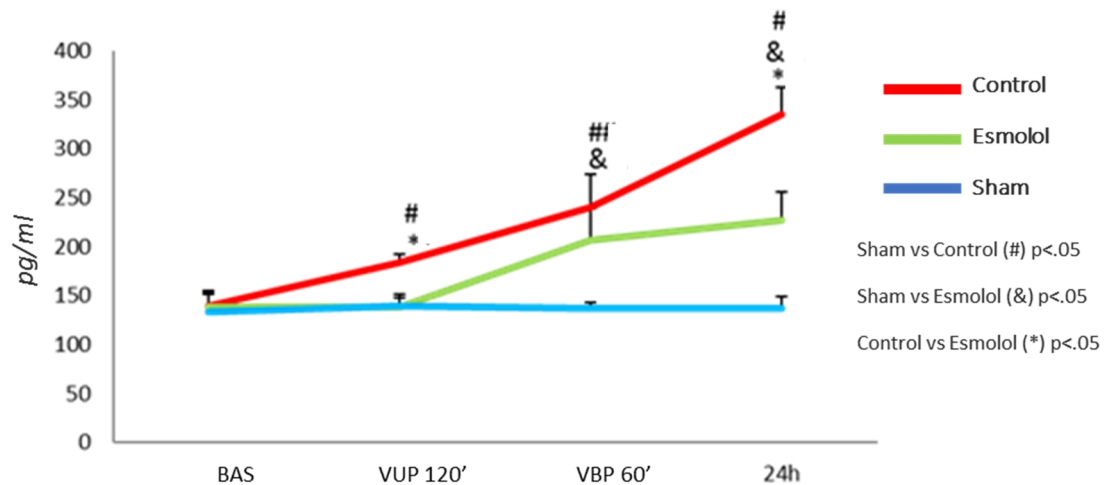
Gráfica 10: IL-1 en suero medido por Western Blot. Datos expresados como media (desviación estándar).

VUP: Ventilación unipulmonar; VBP: Ventilación bipulmonar.

Sham vs Control (#) p<.05

Sham vs Esmolol (&) p<.05

Control vs Esmolol (*) p<.05

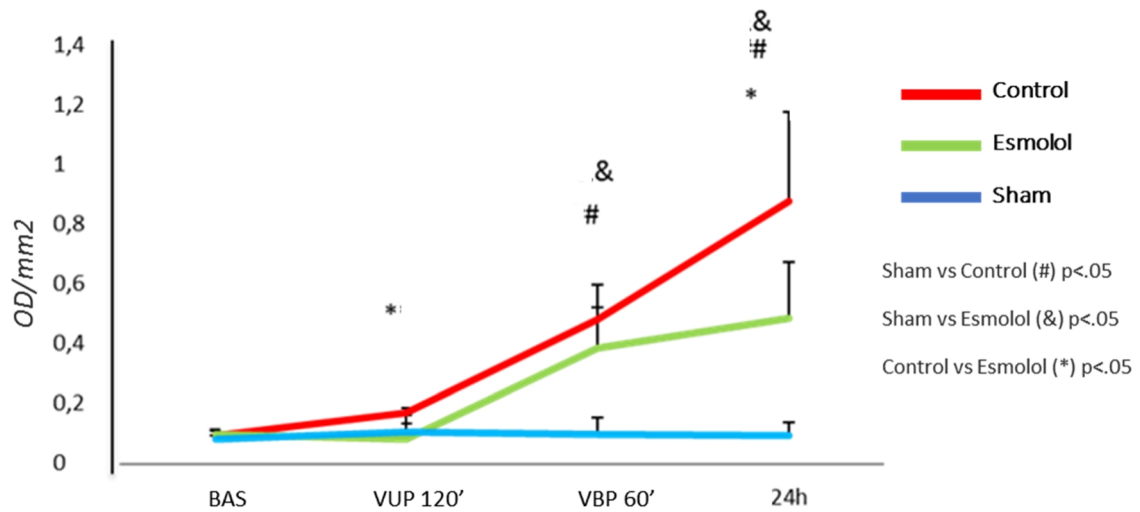


		Basal	VUP120'	VBP60'	24h
IL-1 ELISA (pg/ml)	Control	139 (16)	183 (9)	240 (34)	335 (28)
	Esmolol	138 (13)	138 (13)	207 (32)	227 (29)
	Sham	134 (20)	139 (8)	137 (6)	136 (12)
	ANOVA	0,459	0,003 #, *	0,002 #, &	0,001 #, &, *

Gráfica 11: IL-1 en suero medido por ELISA. Datos expresados como media (desviación estándar). VUP: Ventilación unipulmonar; VBP: Ventilación bipulmonar.
 Sham vs Control (#) $p < .05$
 Sham vs Esmolol (&) $p < .05$
 Control vs Esmolol (*) $p < .05$

Paralelamente a lo observado con $TNF\alpha$, IL-1 va en aumento en los grupos Esmolol y Control a lo largo del experimento, siendo mayor el aumento en el grupo control y manteniéndose en el grupo Sham en niveles similares al basal. El nivel medido en ambos grupos intervenidos fue estadísticamente superior al Sham, y el grupo Esmolol tuvo niveles inferiores al Control de forma significativa tras 24h en ambas mediciones y tras la VUP en ELISA. (Gráficas 10 y 11)

Syndecan



		Basal	VUP120'	VBP60'	24h
Syndecan (OD/mm2)	Control	0,101 (0,021)	0,18 (0,017)	0,503 (0,123)	0,916 (0,311)
	Esmolol	0,105 (0,013)	0,088 (0,056)	0,406 (0,139)	0,506 (0,195)
	Sham	0,088 (0,013)	0,115 (0,056)	0,107 (0,056)	0,1 (0,046)
	ANOVA	0,179	0,004 *	0,008 #, &	0,004 #, &, *

Gráfica 12: Syndecan en suero. Datos expresados como media (desviación estándar). VUP: Ventilación unipulmonar; VBP: Ventilación bipulmonar.

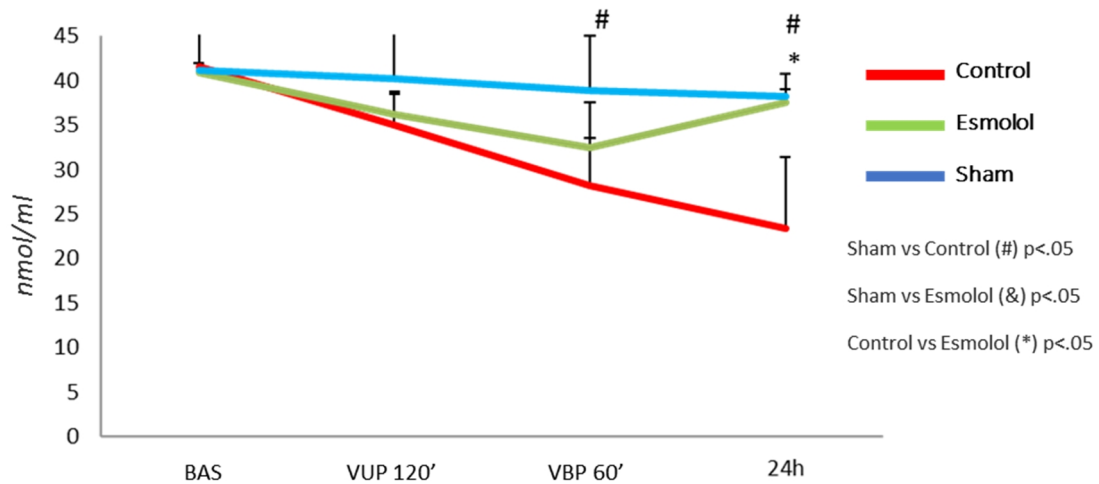
Sham vs Control (#) p<.05

Sham vs Esmolol (&) p<.05

Control vs Esmolol (*) p<.05

El syndecan medido en suero se mantiene similar al basal para el grupo Sham, mientras que aumenta progresivamente para en grupo Control durante todo el procedimiento. El grupo Esmolol mantiene cifras similares a la basal durante la VUP y aumenta posteriormente. Las diferencias entre Esmolol y Control son significativas tras la VUP y pasadas 24h. (Gráfica 12)

NO

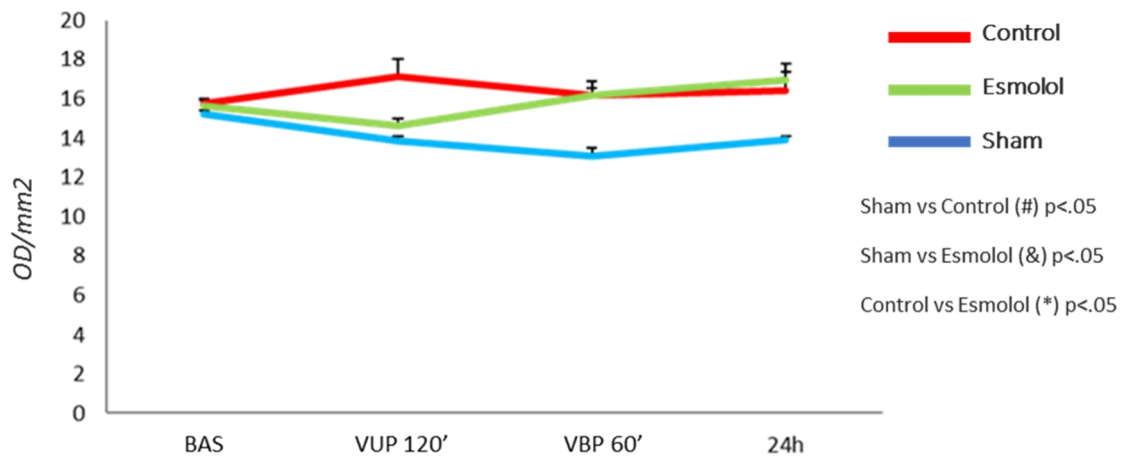


		Basal	VUP120'	VBP60'	24h
NO (nmol/ml)	Control	41,6 (6,2)	35 (3,4)	28,1 (9,4)	23,4 (7,9)
	Esmolol	40,9 (1,1)	36,1 (2,6)	32,5 (1)	37,5 (1,5)
	Sham	41,1 (9,5)	40,2 (5,2)	38,8 (6,2)	38,2 (2,5)
	ANOVA	0,899	0,25	0,05 #	0,003 #, *

Gráfica 13: NO en suero. Datos expresados como media (desviación estándar). VUP: Ventilación unipulmonar; VBP: Ventilación bipulmonar.
 Sham vs Control (#) p<.05
 Sham vs Esmolol (&) p<.05
 Control vs Esmolol (*) p<.05

El NO en suero desciende claramente en el grupo Control a lo largo del experimento, mientras que en el grupo Sham experimenta una bajada más sutil. En el grupo Esmolol baja durante la cirugía, pero posteriormente asciende nuevamente hasta cifras similares al Sham tras 24h. La diferencia a las 24h entre Control y el resto es significativa, mientras que durante la cirugía no hay diferencia significativa estadísticamente entre el Control y el Esmolol. (Gráfica 13)

Catepsina



		Basal	VUP120'	VBP60'	24h
Catepsina (OD/mm ²)	Control	15,7 (3,7)	17,1 (3,8)	16,2 (2,1)	16,4 (2,5)
	Esmolol	15,6 (4,1)	14,6 (2,5)	16,2 (3,9)	17 (6,1)
	Sham	15,2 (7,9)	13,9 (4,2)	13 (6,5)	13,9 (9,7)
	ANOVA	0,907	0,112	0,763	0,887

Gráfica 14: Catepsina en suero. Datos expresados como media (desviación estándar). VUP: Ventilación unipulmonar; VBP: Ventilación bipulmonar.

Sham vs Control (#) p<.05

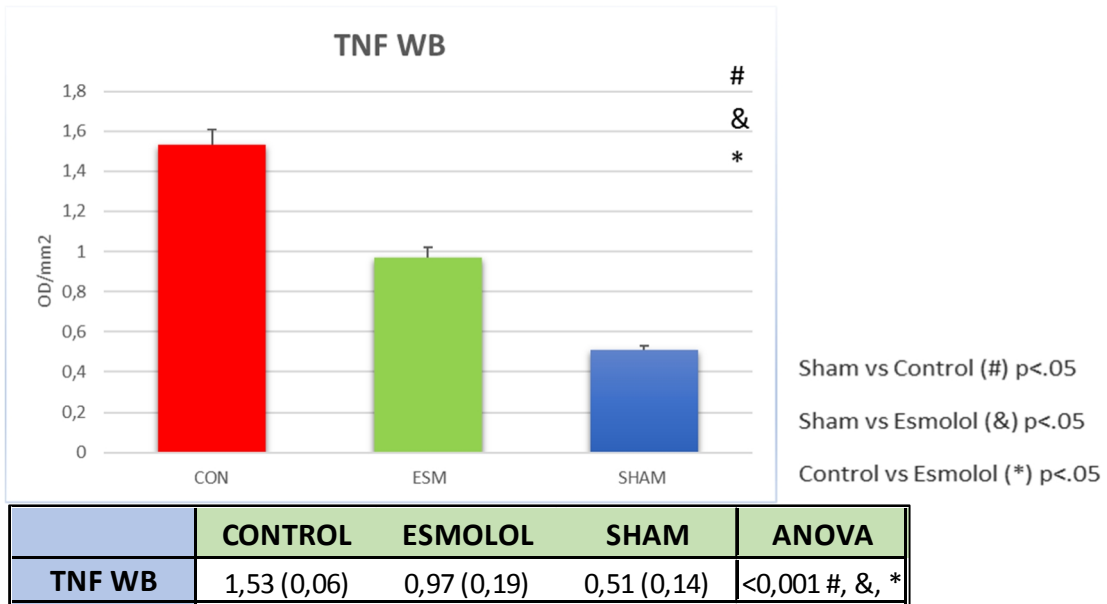
Sham vs Esmolol (&) p<.05

Control vs Esmolol (*) p<.05

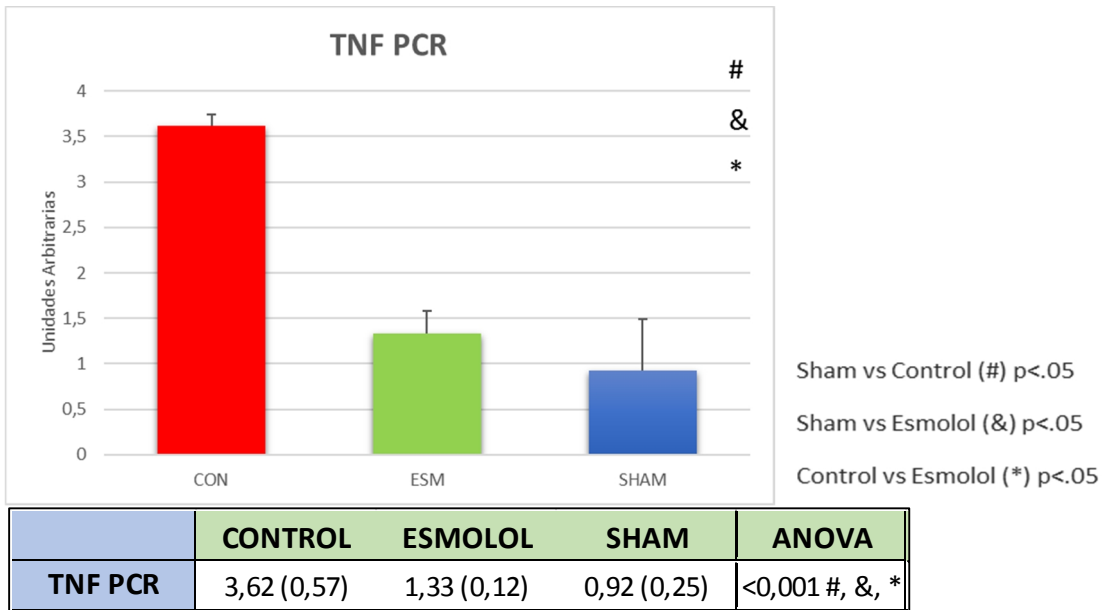
La catepsina medida en suero aumenta ligeramente en el grupo Control tras la ventilación unipulmonar, descendiendo en el grupo Esmolol, igualándose posteriormente ambos grupos en un nivel similar al basal. En el grupo Sham las cifras descienden ligeramente a lo largo de la prueba. No obstante, ninguna de las diferencias fue estadísticamente significativa en este marcador. (Gráfica 14)

3. Biomarcadores en Biopsias hepáticas

TNF α



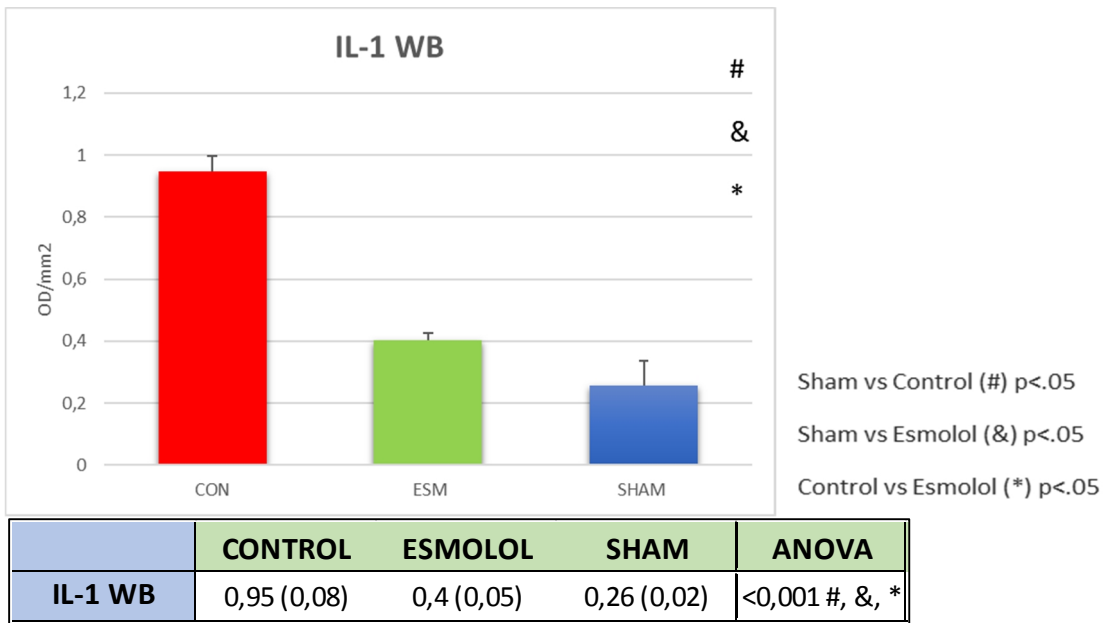
Gráfica 15: TNF α en biopsias hepáticas medido por Western blot. Datos expresados como media (desviación estándar).



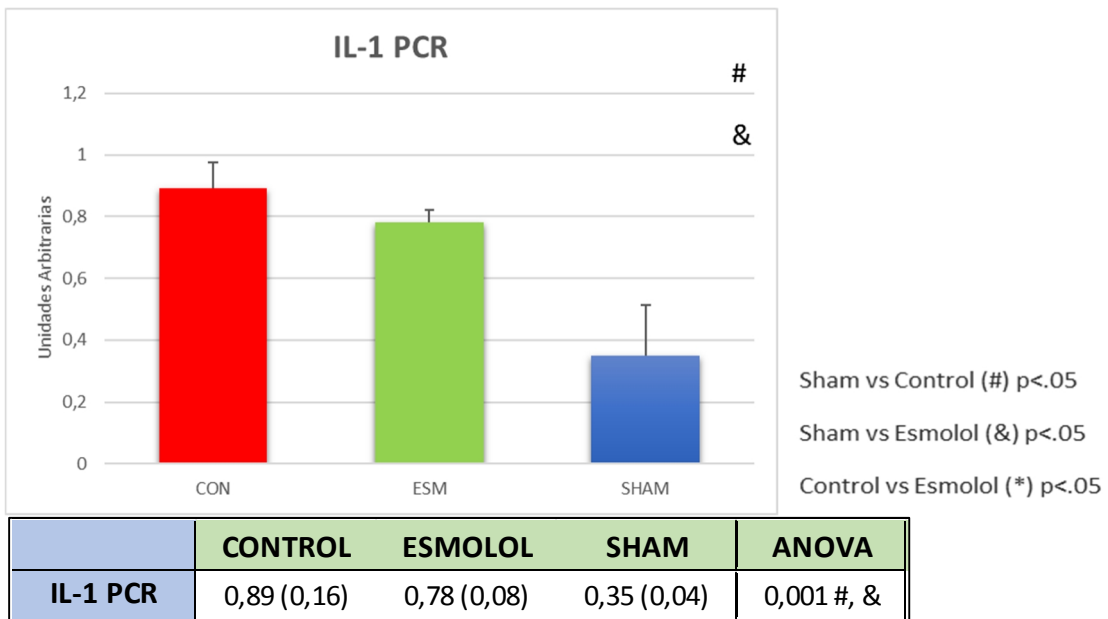
Gráfica 16: TNF α en biopsias hepáticas medido por PCR. Datos expresados como media (desviación estándar).

Se encontraron diferencias significativas en expresión proteica y de ARNm de TNF α en las biopsias hepáticas en todos los grupos, siendo significativamente mayor en el grupo Control, seguido por el Esmolol, y siendo el menor el Sham. (Gráficas 15 y 16)

IL-1



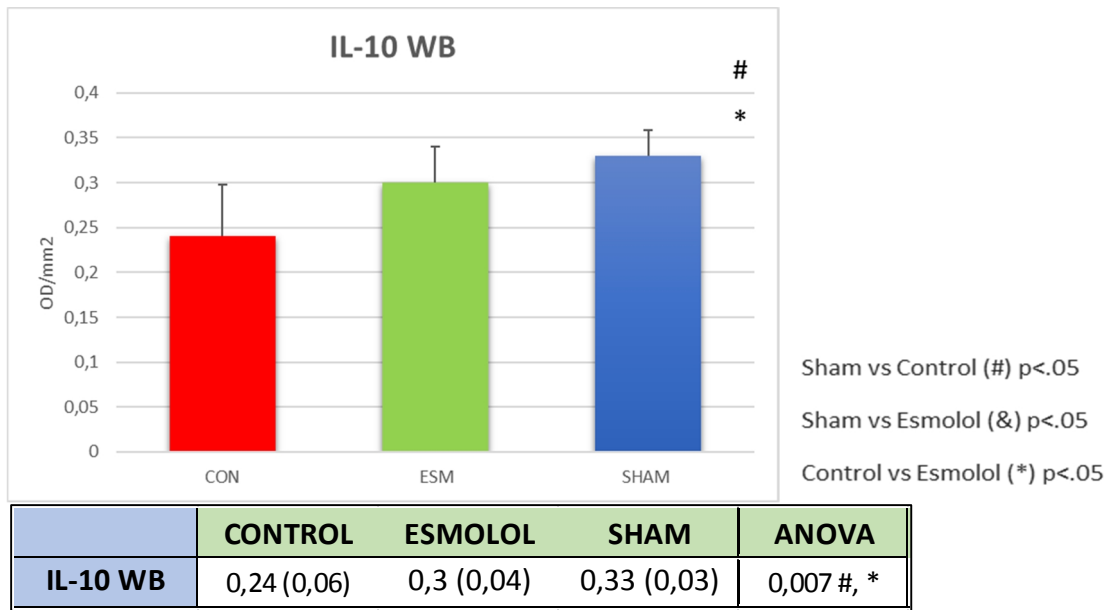
Gráfica 17: IL-1 en biopsias hepáticas medido por Western blot. Datos expresados como media (desviación estándar).



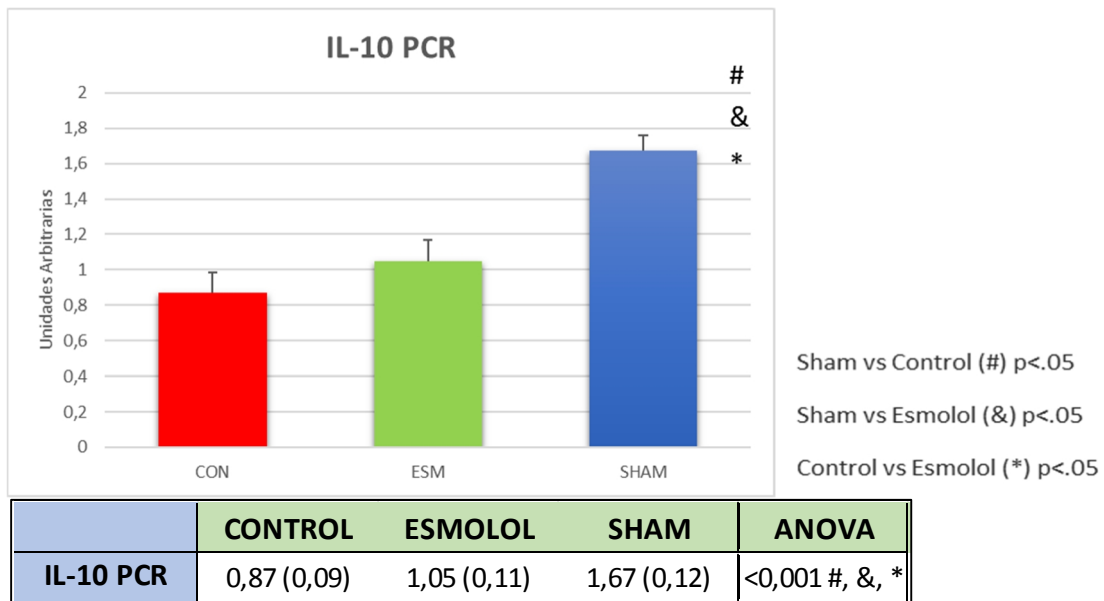
Gráfica 18: IL-1 en biopsias hepáticas medido por PCR. Datos expresados como media (desviación estándar).

IL-1 fue mayor en el grupo Control, seguido de Esmolol y por último Sham en expresión proteica y de ARNm. Medido por Western Blot se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos. No obstante, la diferencia no fue significativa medido por RT-PCR. (Gráficas 17 y 18)

IL-10



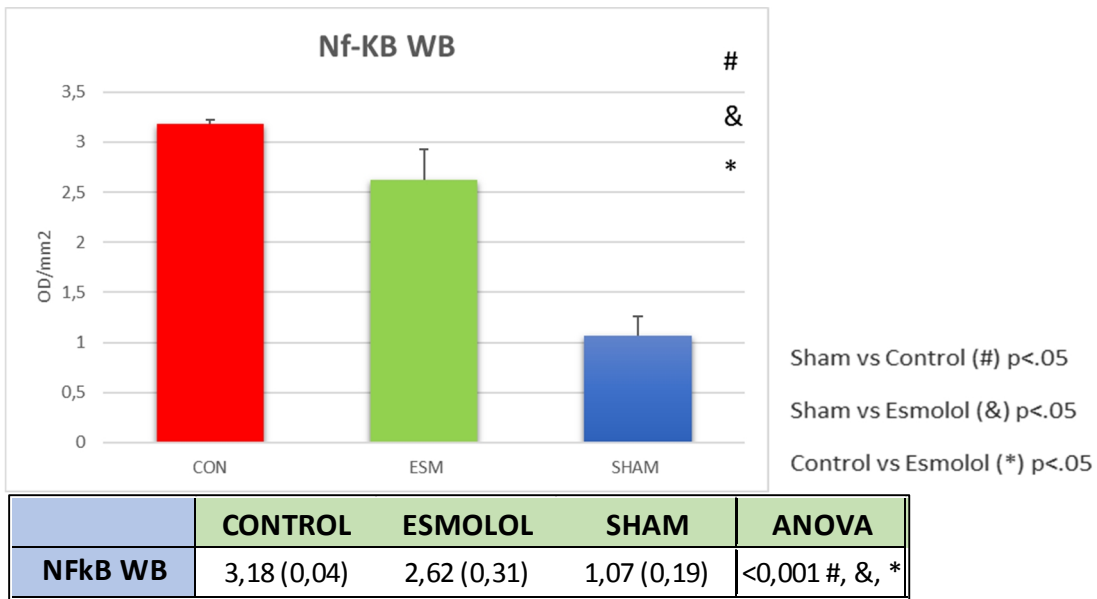
Gráfica 19: IL-10 en biopsias hepáticas medido por Western blot. Datos expresados como media (desviación estándar).



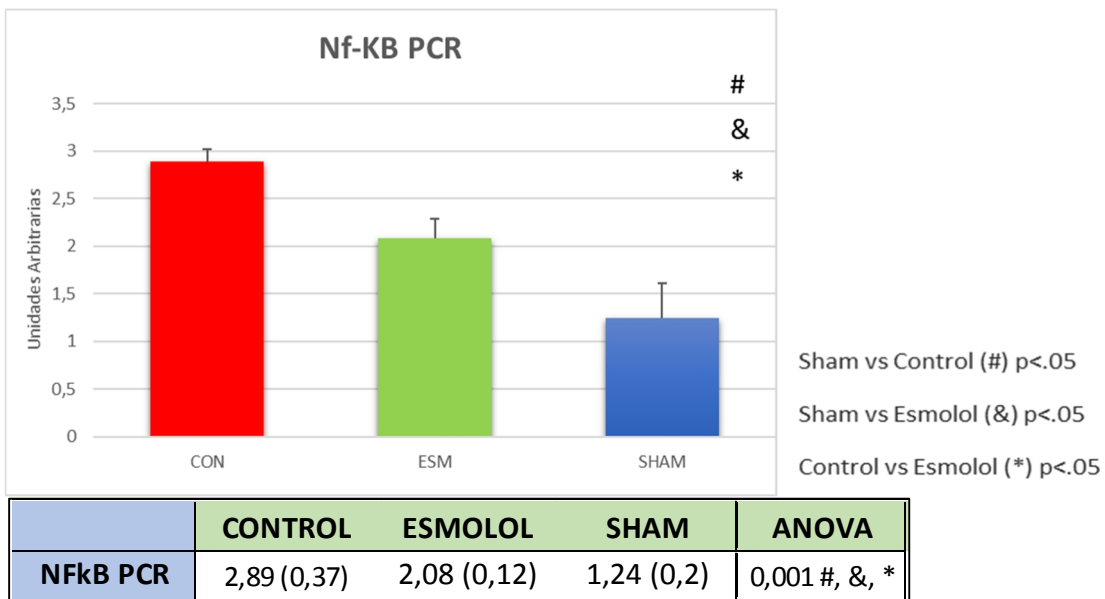
Gráfica 20: IL-10 en biopsias hepáticas medido por PCR. Datos expresados como media (desviación estándar).

En las biopsias hepáticas se observó una expresión proteica y de ARNm de IL-10 más elevada en el grupo Sham, seguido del Esmolol y por último del Control. En el grupo tratado con esmolol esa reducción fue significativamente menor que en Control. IL-10 en Sham fue mayor significativamente que Control con ambos métodos, pero que Esmolol solo medido por RT-PCR. (Gráficas 19 y 20)

NF-κB



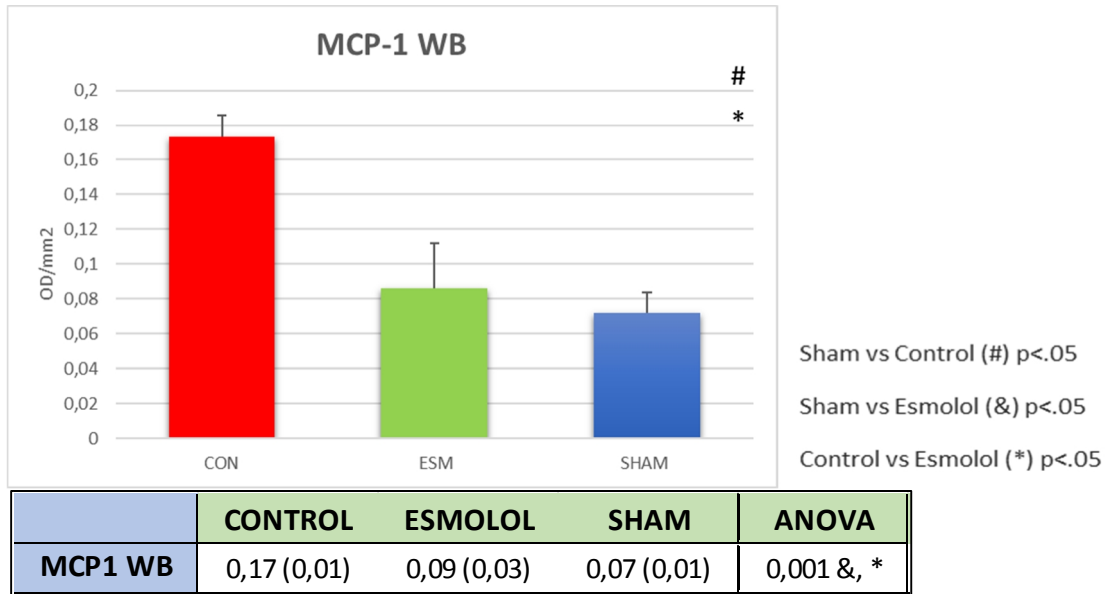
Gráfica 21: NF-κB en biopsias hepáticas medido por Western blot. Datos expresados como media (desviación estándar).



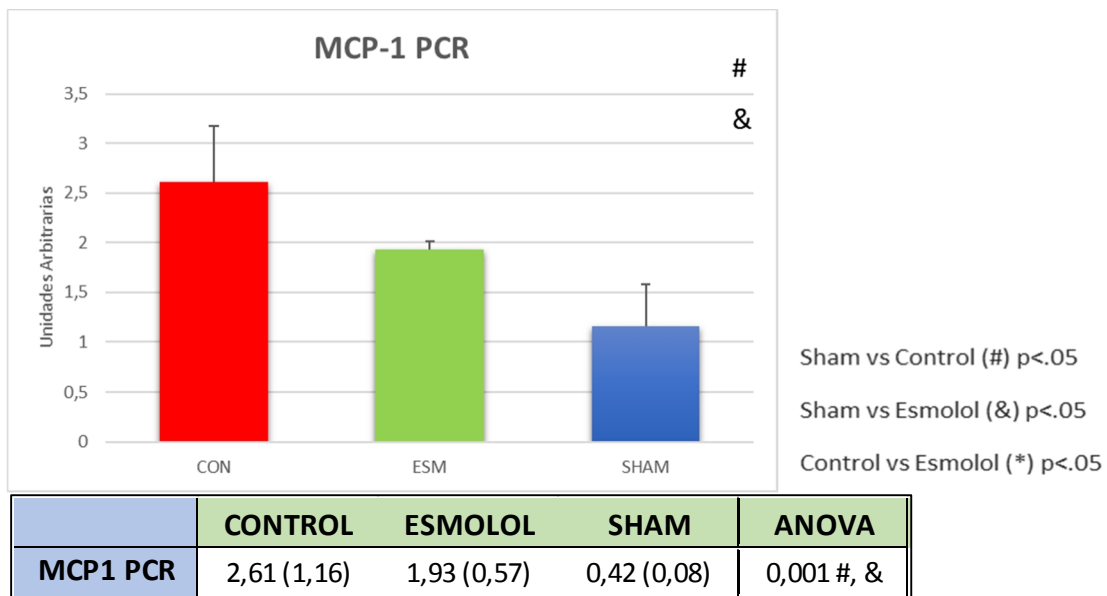
Gráfica 22: NF-κB en biopsias hepáticas medido por PCR. Datos expresados como media (desviación estándar).

La expresión proteica y de ARNm de NF-κB se encuentra en mayor cuantía en las biopsias hepáticas del grupo Control, seguidos del Esmolol y por último el Sham. Todas las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas en ambas mediciones. (Gráficas 21 y 22)

MCP-1



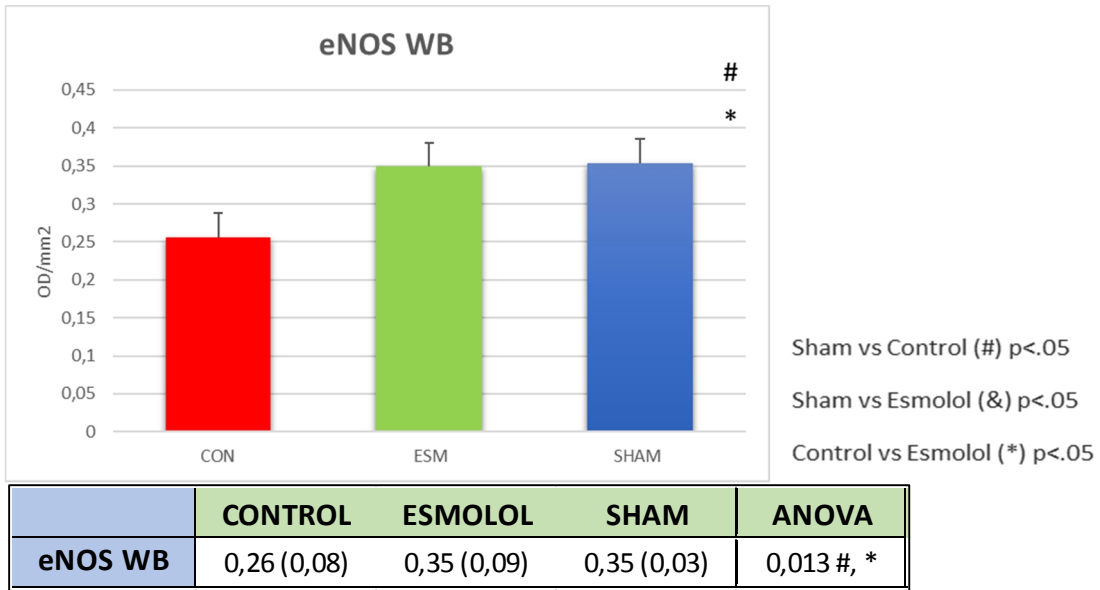
Gráfica 23: MCP-1 en biopsias hepáticas medido por Western blot. Datos expresados como media (desviación estándar).



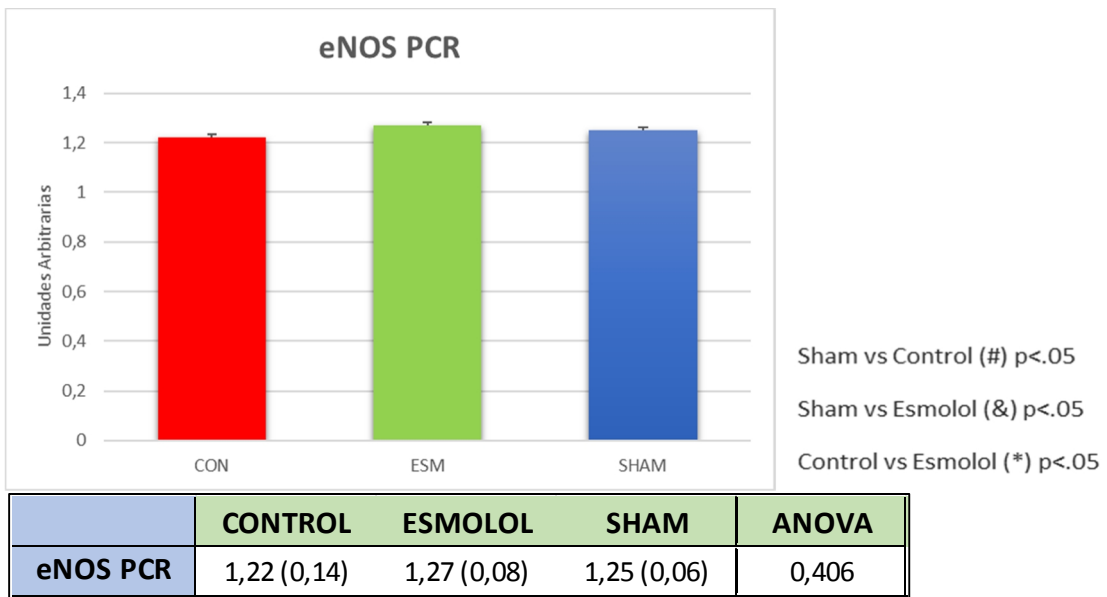
Gráfica 24: MCP-1 en biopsias hepáticas medido por PCR. Datos expresados como media (desviación estándar).

En las biopsias hepáticas se objetivó mayor expresión proteica y de ARNm de MCP-1 en el grupo Control, a continuación el Esmolol, y para finalizar el grupo Sham, con los menores cifras de MCP-1. La diferencia entre Control y Esmolol fue significativa medida por Western Blot, pero no por RT-PCR, mientras que la diferencia entre Esmolol y Sham fue significativa medida por RT-PCR pero no por Western Blot. (Gráficas 23 y 24)

eNOS



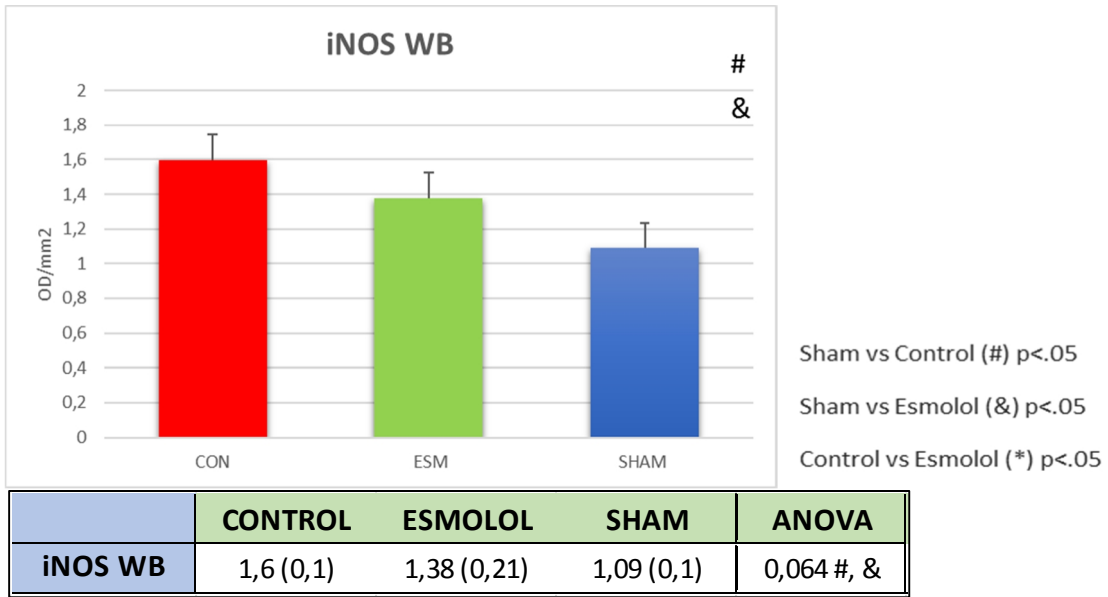
Gráfica 25: eNOS en biopsias hepáticas medido por Western blot. Datos expresados como media (desviación estándar).



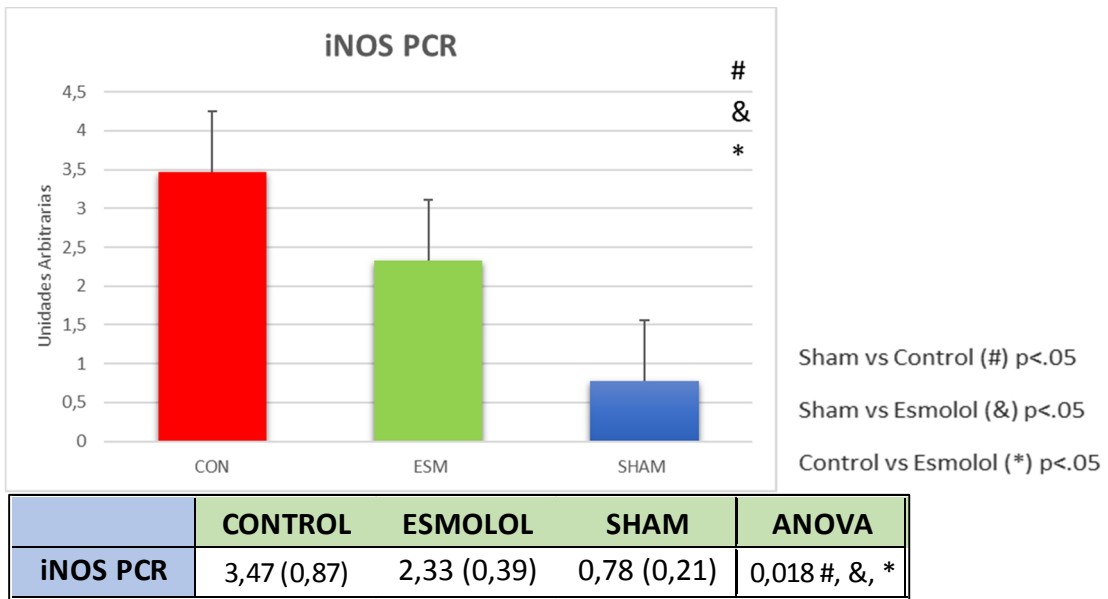
Gráfica 26: eNOS en biopsias hepáticas medido por PCR. Datos expresados como media (desviación estándar).

La expresión proteica y de ARNm de eNOS en las biopsias hepáticas fueron similares en los grupos Sham y Esmolol, siendo menores en el grupo control. La diferencia en expresión proteica fue significativa, mientras que en la RT-PCR no hubo diferencias significativas. (Gráficas 25 y 26)

iNOS



Gráfica 27: iNOS en biopsias hepáticas medido por Western blot. Datos expresados como media (desviación estándar).

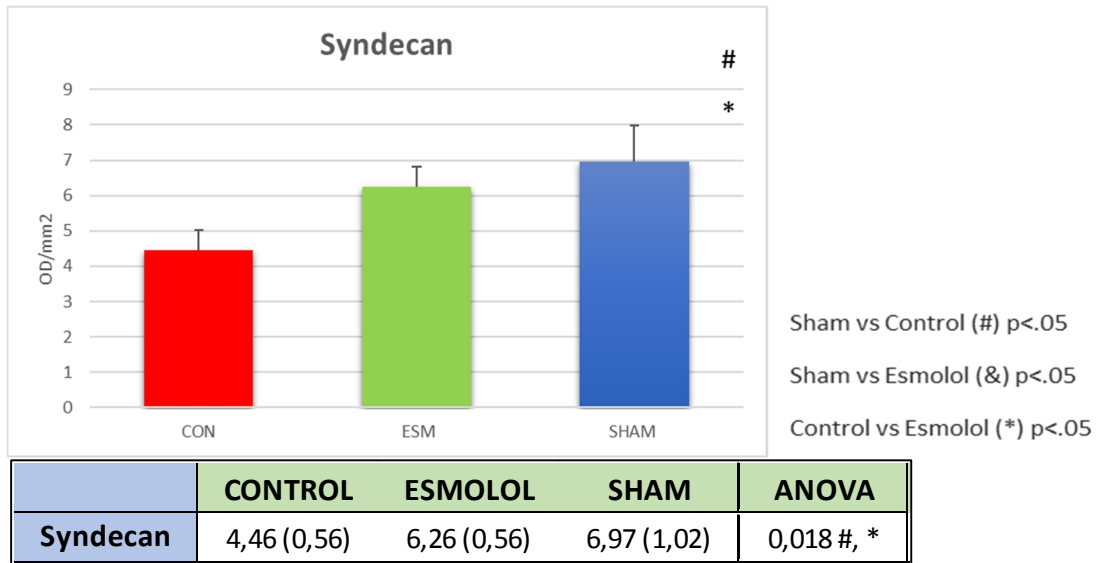


Gráfica 28: iNOS en biopsias hepáticas medido por PCR. Datos expresados como media (desviación estándar).

La expresión proteica y de ARNm de iNOS fue menor en las biopsias del grupo Sham, seguido del grupo Esmolol y mayor en el grupo Control. Entre los grupos Control y Esmolol la diferencia no fue estadísticamente significativa medido por Western blot, pero sí por PCR.

(Gráficas 27 y 28)

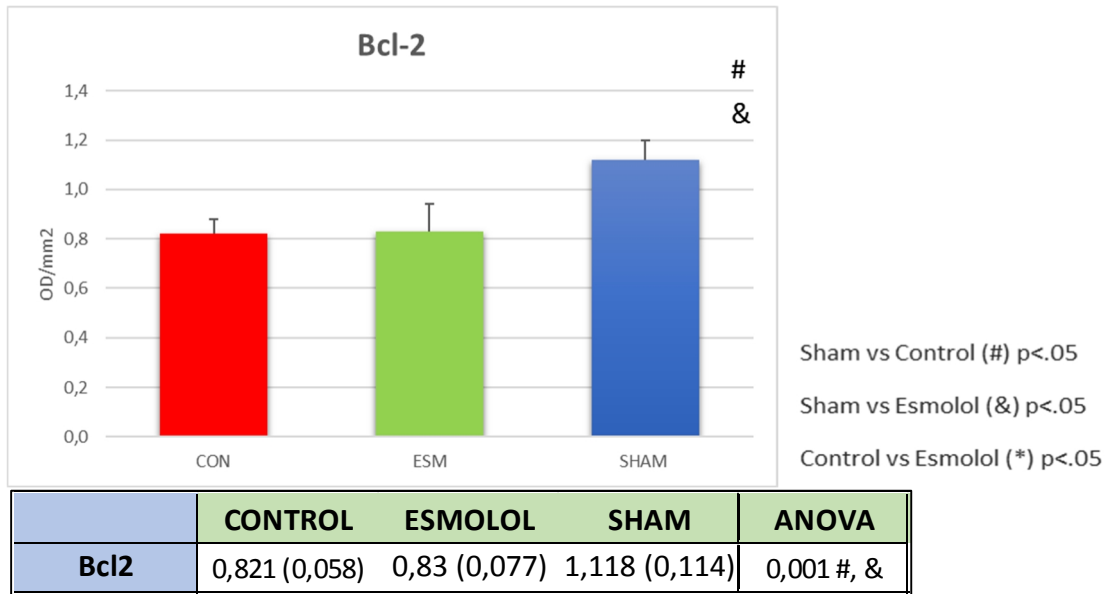
Syndecan



Gráfica 29: Syndecan en biopsias hepáticas. Datos expresados como media (desviación estándar).

La expresión proteica de syndecan fue más alta en el grupo Sham, seguido del grupo Esmolol, y por último en el grupo Control. La diferencia entre los grupos Esmolol y Sham no fue significativa, mientras que el resto de las diferencias sí lo fueron. (Gráfica 29)

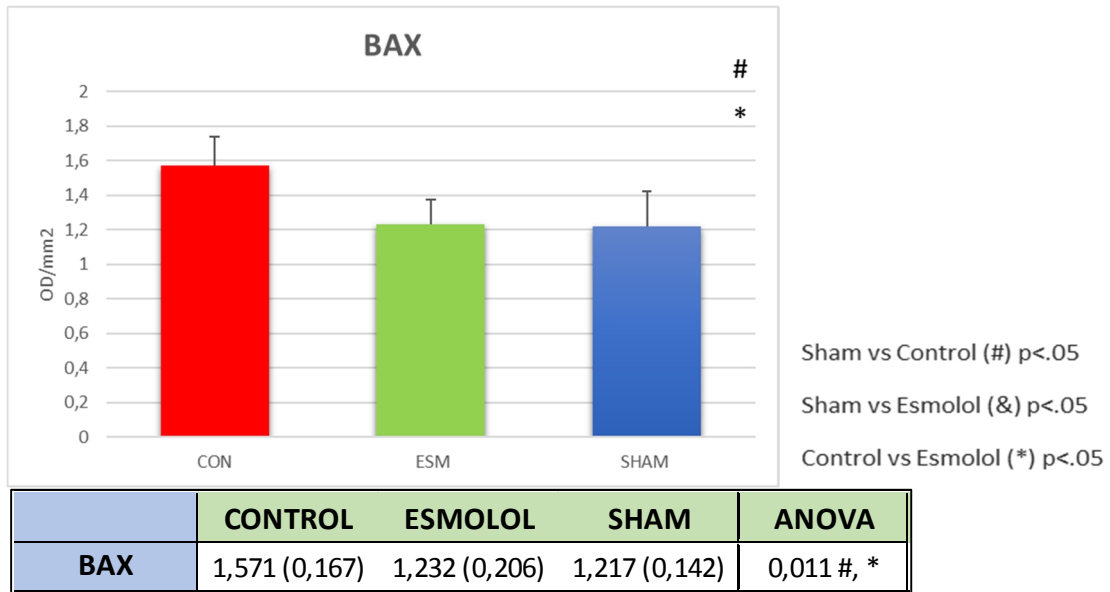
Bcl-2



Gráfica 30: Bcl-2 en biopsias hepáticas. Datos expresados como media (desviación estándar).

La expresión proteica de Bcl-2 en hígado fue menor en los grupos Control y Esmolol que en el Sham. No hubo diferencias significativas estadísticamente entre Control y Esmolol, mientras que la medida en Sham fue superior significativamente que ambas. (Gráfica 30)

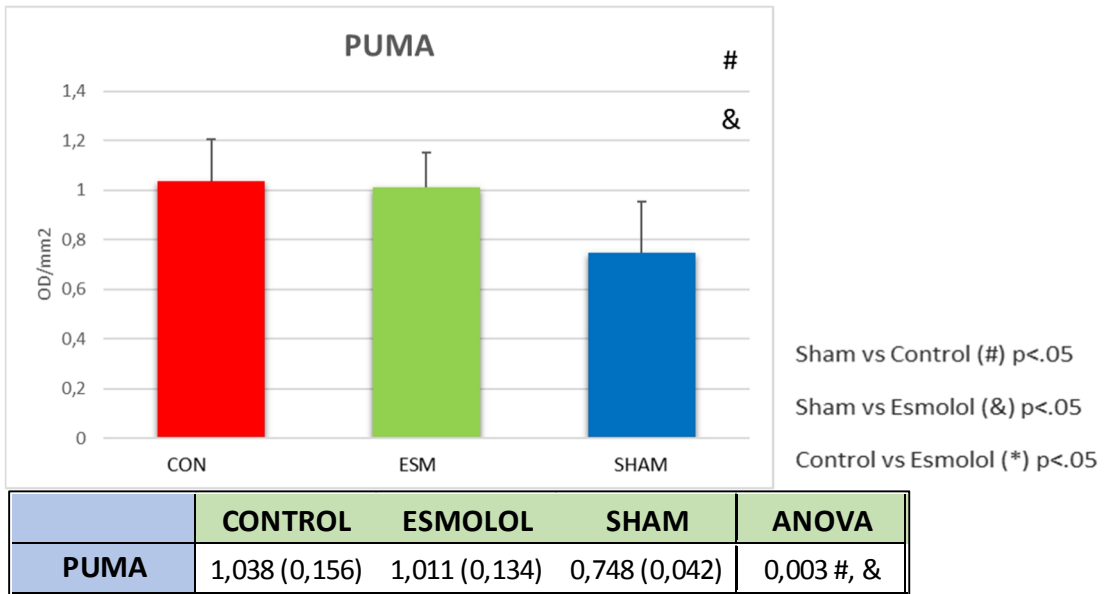
BAX



Gráfica 31: BAX en biopsias hepáticas. Datos expresados como media (desviación estándar).

BAX fue mayor en el grupo Control que en los otros dos grupos, que entregaron medidas similares. La diferencia fue significativa entre Control y los otros grupos, que no fueron estadísticamente diferentes entre sí. (Gráfica 31)

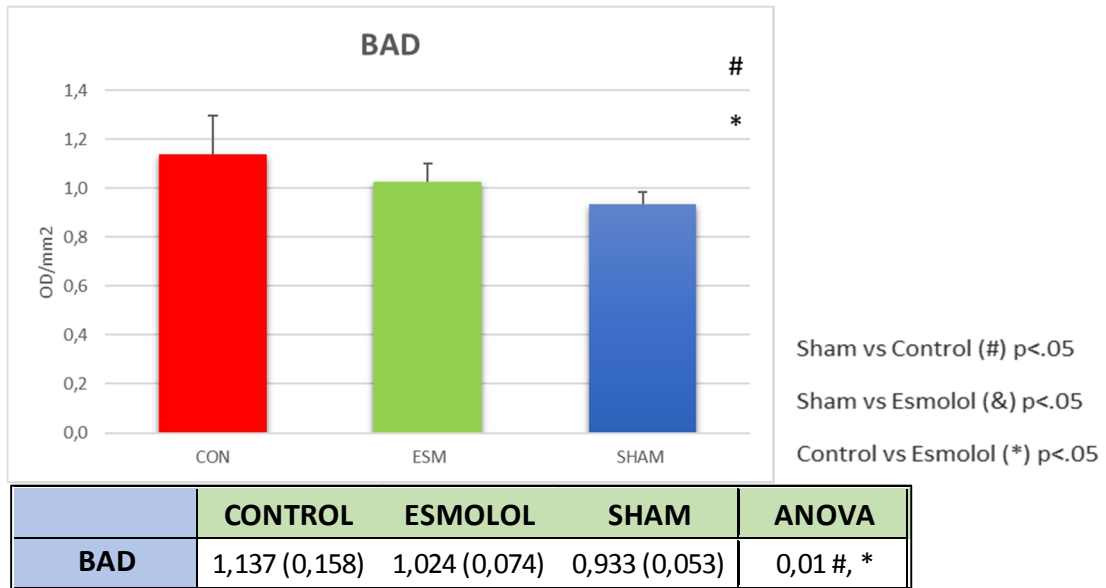
PUMA



Gráfica 32: PUMA en biopsias hepáticas. Datos expresados como media (desviación estándar).

En las biopsias hepáticas la expresión proteica de PUMA fue similar entre los grupos Control y Esmolol, siendo superiores a la expresión del grupo Sham. El grupo Sham obtuvo una medida significativamente inferior a los otros dos, entre los que no hubo diferencias estadísticamente significativas. (Gráfica 32)

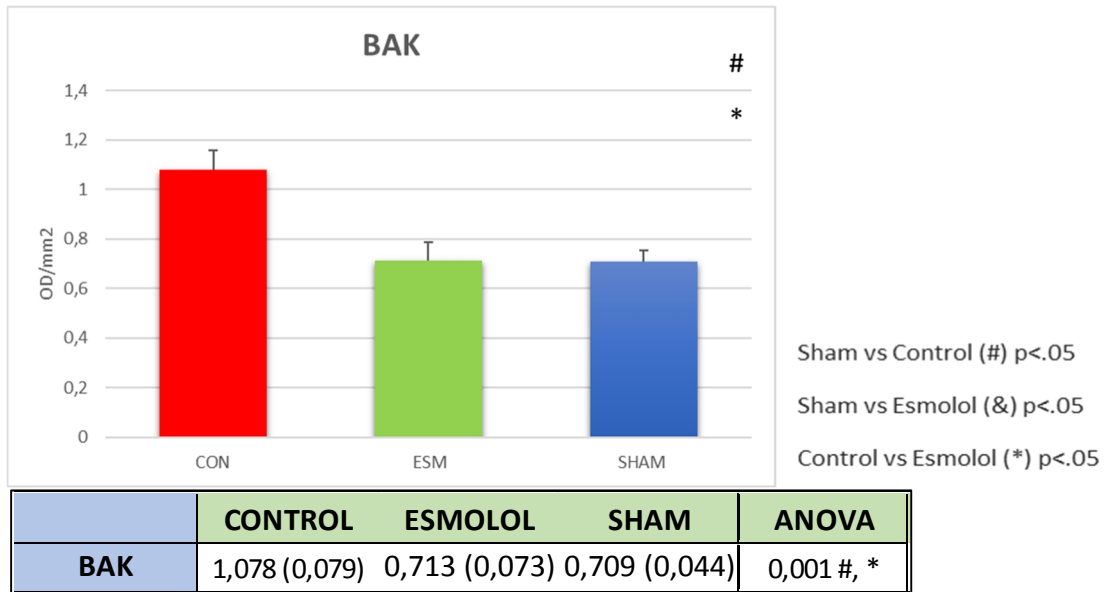
BAD



Gráfica 33: BAD en biopsias hepáticas. Datos expresados como media (desviación estándar).

La expresión de BAD en las biopsias fue superior en el grupo Control, seguido del Esmolol y por último el Sham. Hubo diferencia estadísticamente significativa entre Control y los otros dos grupos, pero no así entre los grupos Esmolol y Sham. (Gráfica 33)

BAK



Gráfica 34: BAK en biopsias hepáticas. Datos expresados como media (desviación estándar).

BAK medido en biopsia hepática fue también superior en el grupo Control con respecto a Sham y Esmolol, que obtuvieron resultados similares. Entre Sham y Esmolol no existieron diferencias estadísticamente significativas, mientras que la medida en el grupo Control fue significativamente mayor. (Gráfica 34)

Discusión

En nuestro estudio experimental queda demostrado, tal y como habíamos propuesto en la hipótesis, que la administración intravenosa de esmolol durante la cirugía de resección pulmonar atenúa la respuesta inflamatoria sistémica y hepática, así como el daño al glicocálix y la apoptosis en el parénquima hepático. Estos efectos del tratamiento con esmolol son independientes de sus efectos hemodinámicos.

1. Efecto hemodinámico

Una de las razones que se ha esgrimido clásicamente para la conocida atenuación que producen los betabloqueantes en la respuesta inflamatoria son sus efectos hemodinámicos. Esto se observa en diferentes experimentos realizados con esmolol a dosis más altas, 10mg/kg/h o superior, en los que los efectos hemodinámicos parecen proporcionales a los efectos de inmunomodulación.^{163 179}

En el estudio de Suzuki, demostrando la capacidad del esmolol de reducir el fallo miocárdico asociado a la sepsis en ratas, se utilizan dosis de esmolol que reducen significativamente la frecuencia cardiaca de los animales, alimentado la hipótesis de que el menor consumo de oxígeno y mejor perfil metabólico de los miocitos puede justificar la mejora de la función cardiaca y la disminución en mediadores inflamatorios.¹⁶³ Mori en su estudio parte con el objetivo de una dosis de esmolol que reduzca la FC un 20%, 15mg/kg/h, observando con ello una reducción de la respuesta inflamatoria a nivel intestinal.¹⁷⁹

Uno de los estudios más influyentes es el de Morelli, en el que demuestra una reducción de la mortalidad y de las necesidades de fármacos vasoactivos tratando a pacientes en estado de shock séptico con dosis de esmolol tituladas para mantener su frecuencia cardiaca entre 80 y 94lpm.¹⁸⁰

En el contexto de la cirugía torácica y la ventilación mecánica tiene también especial relevancia el efecto hemodinámico del esmolol, potencialmente reduciendo el gasto cardiaco,

ya que el flujo sanguíneo pulmonar aumentado, como comentamos previamente, contribuye al daño producido por la ventilación mecánica, y reducir este hiperaflujo puede ser beneficioso a la hora de reducir el daño pulmonar.⁴³

En vistas a lo anterior, en nuestro experimento nos fijamos el objetivo de utilizar una dosis que tuviera un efecto mínimo sobre la frecuencia cardiaca, manteniendo los efectos hemodinámicos lo más bajos posible, con objetivo de discernir la causa fundamental de los hallazgos del mismo.

Los efectos hemodinámicos de administrar esmolol a nuestros animales fueron muy poco relevantes, lo cual nos sugiere que estas mínimas modificaciones hemodinámicas no fueron las principales responsables del comportamiento de los biomarcadores inflamatorios perioperatorios en este modelo experimental.

El experimento de Wei se realizó con dosis de esmolol de 5 mg/kg/h, al igual que el nuestro, en su caso en ratas. Con esta dosis no se objetivó disminución de la frecuencia cardiaca de los animales, pero sí demostró mejora en la función miocárdica y vasorreactividad en los sujetos en el contexto de sepsis, pudiéndose atribuir por lo tanto este resultado al efecto inmunomodulador del fármaco.¹⁶⁸ A nivel hepático existen también ensayos realizados con betabloqueantes que muestran reducción de citoquinas proinflamatorias circulantes, considerando también que al menos parte de estos efectos son independientes de los efectos hemodinámicos.¹⁹²

En el ámbito quirúrgico destacan los experimentos de Kim, utilizando dosis de esmolol tanto con efecto cronotrópico negativo como sin él para mitigar la liberación de mediadores inflamatorios. En este caso, en el grupo tratado con dosis de esmolol sin efecto cronotrópico, 4 mg/kg/h no objetivó un descenso estadísticamente significativo de las citoquinas proinflamatorias, a diferencia de nuestro estudio, aunque sí lo fue a dosis mayores.^{172, 173}

Esta ausencia de efectos hemodinámicos incrementa también la potencial utilidad de esos resultados. Recordando el estudio POISE, la introducción de betabloqueantes en el preoperatorio no se recomienda, ya que aumenta el riesgo de hipotensión y bradicardia, de ictus, y en última instancia la mortalidad.¹⁵⁶ Este estudio se centra en metoprolol oral a dosis terapéuticas. Sabemos que en muchos pacientes en el contexto quirúrgico puede resultar nocivo el reducir su gasto cardiaco, tensión arterial y frecuencia cardíacas, de cara a potenciales complicaciones postoperatorias como lesión miocárdica, insuficiencia renal, ictus, etc.^{193 194} No obstante, la utilización de esmolol, un fármaco con una vida media mucho más corta, aplicado a dosis con mínimo efecto hemodinámico, presenta un perfil de seguridad más favorable.

Respaldando lo anterior, el ensayo clínico de Zhang en el contexto de cirugía abdominal en pacientes añosos contribuye a avalar la seguridad de esmolol en el perioperatorio. En este estudio, 60 pacientes con edad superior a 60 años son sometidos a una cirugía de gastrectomía laparoscópica, administrándose a la mitad de ellos una perfusión de esmolol intravenoso. A pesar de encontrarse diferencias significativas en FC y PAM entre ambos grupos, no existieron diferencias en los marcadores de isquemia que analizaron ni en la incidencia de eventos cerebrovasculares, que fue nula en ambos grupos.¹⁹⁵

Nuestros hallazgos confirman que la atenuación de la respuesta inflamatoria observada es, como mínimo, parcialmente independiente de los efectos hemodinámicos del fármaco.

2. Efecto respiratorio

Otro de los motivos por el que usamos estas dosis de esmolol en el estudio, con objetivo de facilitar su traslado a la práctica clínica, son los potenciales efectos pulmonares de los betabloqueantes. Clásicamente los betabloqueantes han estado contraindicados en pacientes con hiperreactividad bronquial, como por ejemplo los pacientes con OCFA (Obstrucción Crónica

al Flujo Aéreo), condición muy prevalente en pacientes que se someten a cirugías de resección pulmonar.¹⁹⁶ El esmolol es un betabloqueante cardiosselectivo, antagonista β_1 puro, sin embargo puede existir preocupación de que a dosis elevadas pierda selectividad y por lo tanto tenga un efecto negativo sobre la reactividad bronquial.¹⁹⁷

No obstante, en estudios más recientes se ha descrito que betabloqueantes cardiosselectivos como el esmolol no disminuyen significativamente la FEV1, o exacerbaban significativamente los síntomas respiratorios, ni alteran de forma significativa la respuesta de la FEV1 a los agonistas β_2 en comparación con placebo.¹⁹⁸ También se ha comprobado la seguridad de la administración de esmolol en el ámbito perioperatorio en pacientes con hiperreactividad bronquial con estudios experimentales con dosis de esmolol superiores a la usada en este estudio.¹⁹⁹

No solo existe evidencia acerca de la seguridad de estos fármacos en pacientes con hiperreactividad bronquial, sino que disponemos también de creciente evidencia que sugiere que los betabloqueantes cardiosselectivos pueden tener efectos beneficiosos en este tipo de pacientes. En ratones asmáticos en tratamiento con betabloqueantes se ha observado una menor expresión de mediadores proinflamatorios en lavados bronquioalveolares.²⁰⁰ En pacientes con OCFA, el tratamiento con betabloqueantes parece disminuir las reagudizaciones de su enfermedad,²⁰¹ y pueden mejorar su calidad de vida e incluso reducir la mortalidad.²⁰² Esto puede ser consecuencia de sus efectos cardioprotectores, pero no se puede descartar que influyan otros efectos beneficiosos a nivel pulmonar, como la inmunomodulación.

En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en cuanto a los parámetros gasométricos ni en cuanto a las presiones en la vía aérea entre los grupos estudiados, excluyendo el hecho de que el grupo Sham mantuvo presiones menores durante la fase de VUP ya que dicho grupo no se encontraba sometido a VUP sino a VBP en esa medición. Tampoco se

observó ninguna complicación respiratoria en ninguno de los animales estudiados, favoreciendo la hipótesis de que la utilización de esmolol es segura a nivel respiratorio en esta cirugía.

La principal limitación con respecto a este resultado es el hecho de que los animales del estudio eran previamente sanos, sin ninguna patología pulmonar, lo cual contrasta con los pacientes habituales en cirugías de este tipo.

3. Respuesta inflamatoria sistémica

Como hemos establecido, la severidad del trauma quirúrgico es proporcional a la cantidad de citoquinas proinflamatorias que se liberan durante el mismo, y éstas se relacionan negativamente con los resultados clínicos. Es bien conocido también que la respuesta catecolaminérgica es directamente proporcional a la severidad del trauma quirúrgico. Estas catecolaminas a su vez tienen un efecto complejo sobre el sistema inmune, si bien este efecto es netamente contrario a la reacción inflamatoria. Por otra parte, se relacionan con la inmunodepresión postoperatoria, deprimiendo la capacidad de fagocitosis de los neutrófilos y alterando su capacidad de liberar especies reactivas de oxígeno.¹³¹

Al comparar en nuestro estudio los marcadores en sangre del grupo Sham con los del grupo Control podemos observar el efecto que tiene la lobectomía y la ventilación mecánica unipulmonar sobre la respuesta inflamatoria sistémica. El aumento de TNF e IL-1 atribuible únicamente a la VUP y la lobectomía resulta significativo en todas las fases de la cirugía, concordando con lo establecido previamente del gran impacto inflamatorio que suponen las cirugías torácicas y la VUP.²⁵

Están bien establecidos los efectos antiinflamatorios del esmolol en situaciones de sepsis.^{165, 177, 179, 180} El carvedilol, otro betabloqueante cardioselectivo, ha demostrado también reducir los niveles de TNF en otro estado proinflamatorio, el síndrome de ovario poliquístico.²⁰³

Dentro del ámbito de la cirugía también ha demostrado disminuir la respuesta inflamatoria en el contexto de la laparoscopia abdominal, concretamente de IL-6 e IL-4, aunque ligados a un descenso de la frecuencia cardiaca, como comentamos previamente.^{172, 173} En este ámbito disponemos también del reciente estudio de Tan, demostrando también los efectos antiinflamatorios de otro betabloqueante selectivo para β_1 , en este caso metoprolol, un fármaco con mayor vida media. En este estudio administra el fármaco a ratas sometidas a cirugía abdominal abierta, demostrándose un descenso significativo en la producción de TNF α e IL-6, aunque no de IL-1.²⁰⁴

Estos hallazgos concuerdan con los nuestros, en los que observamos una disminución significativa en las citoquinas proinflamatorias IL-1 y TNF α en el grupo tratado con esmolol. Hasta donde hemos podido comprobar, este es el primer experimento que demuestra estos efectos en cirugía torácica, y el primero que demuestra una reducción sistémica de mediadores inflamatorios tan significativa sin modificar notablemente los parámetros hemodinámicos.

Excluyendo por lo tanto las justificaciones hemodinámicas esgrimidas en otros estudios para explicar estos efectos, debemos considerar otras vías antiinflamatorias. En primer lugar, el bloqueo directo del propio receptor β_1 . En el experimento de Grisanti se demuestra que la estimulación de receptores β_1 en monocitos produce una respuesta proinflamatoria. En su estudio aísla monocitos humanos y los expone a un lipopolisacárido bacteriano junto con un agonista β_1 , demostrándose un aumento en la liberación de TNF α e IL-1 por parte de los monocitos, comparado con el grupo control sin dicho agonista.¹³⁷ El bloqueo de los receptores β_1 por parte del esmolol, por lo tanto, tendría un efecto contrario, reduciendo la producción de estas citoquinas por parte de los monocitos.

El segundo mecanismo a valorar es que al bloquear los receptores β_1 se produzca una estimulación preferente de los receptores β_2 , un receptor que, como hemos establecido, es más prevalente en las células del sistema inmune y tiene un efecto claramente contrario a la

liberación de citoquinas proinflamatorias.^{127, 128, 129} Este mecanismo ha sido postulado previamente por Ackland en su estudio, en el que demostraba mejora en la supervivencia y menor respuesta inflamatoria en ratas sépticas tratadas con metoprolol, otro betabloqueante cardiosselectivo. En su caso administró metoprolol tanto por vía intravenosa como intraventricular (en los ventrículos cerebrales) para dilucidar si el efecto beneficioso provenía del SNC, observando únicamente disminución de los marcadores inflamatorios en el grupo tratado por vía intravenosa, reforzando que el efecto protector viene dado por el bloqueo de receptores periféricos, no del SNC.¹⁷¹

El tercer mecanismo que podemos tener en cuenta incluye el SNP. Sabemos que la activación del SNP tiene un efecto antiinflamatorio.¹⁴⁶ El bloqueo de receptores adrenérgicos podría desplazar el equilibrio entre el SNS y SNP hacia este último, favoreciendo por lo tanto su efecto antiinflamatorio. Esta teoría fue propuesta por Xu, en su estudio administrando el betabloqueante no selectivo propranolol a ratas en las que posteriormente provocaría sepsis, objetivando un descenso de TNF α e IL-6 en las ratas con este pretratamiento.²⁰⁵ No obstante, esta teoría no está comprobada experimentalmente, siendo necesarios más estudios.

Por otra parte, se sabe que estos mismos receptores β 1 también están fuertemente ligados con la inmunosupresión que se da en estados de inflamación descontrolada como la sepsis.²⁰⁶ El bloqueo de los receptores β 1 mantiene inalterada la función de los neutrófilos y su capacidad para producir ROS, a diferencia del bloqueo β 2, que tendería a reducirla.²⁰⁷ Por ello, el bloqueo producido por el esmolol no solo reduciría la respuesta inflamatoria inicial, sino que también podría tener un efecto beneficioso adicional, evitando la inmunosupresión posterior. Esto, no obstante, escapa de los parámetros de nuestro estudio.

4. Daño Endotelial

Los niveles de catecolaminas circulantes no solo han demostrado relación con la inflamación, sino que también está descrita su relación con el daño al glicocálix endotelial.⁸⁷ En otras cirugías mayores, como la cirugía vascular, está comprobado el importante deterioro del glicocálix que asocian.²⁰⁸ El endotelio vascular carece de receptores β_1 adrenérgicos, pero paradójicamente existe cada vez una mayor evidencia de los betabloqueantes β_1 selectivos tienen la capacidad de mejorar la reactividad vascular en situaciones relacionadas con la vasoplejia y el daño endotelial. El tratamiento con esmolol ha demostrado reducir las necesidades de vasoconstrictores para mantener la PAM¹⁶⁴ además de beneficios para la microcirculación en modelos de sepsis.²⁰⁹

El efecto deletéreo que tiene la VUP y la resección pulmonar sobre el glicocálix queda demostrado en nuestro estudio, atendiendo a los mayores niveles de syndecan-1 observados en el grupo Control con respecto al Sham, siendo el syndecan-1 uno de los principales componentes estructurales del glicocálix y su presencia en sangre un dato ampliamente utilizado como marcador de daño al mismo, como comentamos previamente. A su vez queda patente el efecto protector del glicocálix que ejerce el esmolol, reduciendo notablemente los niveles de syndecan-1.

Existen tres mecanismos comprobados en nuestro estudio que pueden explicar este efecto. En primer lugar, la atenuación de la respuesta inflamatoria observada puede proteger frente al daño endotelial. Schmidt demostró que TNF α es un factor fundamental en la degradación del glicocálix observada en la sepsis, comprobando que al inyectarlo en ratones produce la degradación del glicocálix mediado por la activación de heparanasa.²¹⁰ La disminución de TNF α mediada por esmolol por lo tanto evitaría la degradación mediada por esta citocina.

En segundo lugar, tenemos el estrés oxidativo. La inflamación es una fuente importante de ROS y otras moléculas con potencial oxidativo, y este estrés oxidativo es uno de los factores que

puede precipitar la degradación del glicocálix.²¹¹ El esmolol ha demostrado tener un efecto antioxidante, reduciendo marcadores de oxidación y favoreciendo la acción de moléculas *scavenger*, moléculas capaces de reducir las ROS, neutralizando su capacidad lesiva.¹⁷⁰ Esta capacidad antioxidante, por lo tanto, puede permitir al esmolol ejercer como protector del glicocálix.

En la misma línea de que lo anterior tenemos la reducción de iNOS producida por esmolol. Las especies reactivas de nitrógeno (RNS) tienen también gran potencial oxidativo y por lo tanto potencial para dañar el glicocálix. El iNOS es una fuente importante de estas RNS, y la reducción de sus niveles por lo tanto puede contribuir a la protección del glicocálix.⁷³

El último mecanismo a tener en cuenta es la reducción del daño mecánico producido por cambios hemodinámicos asociados a la administración del esmolol. El daño mecánico puede producir redistribución y degradación de ciertas partes del glicocálix.²¹² El los efectos hemodinámicos del esmolol han demostrado tener la capacidad de reducir este estrés mecánico,²¹³ pero como indicábamos previamente esta hipótesis es menos probable por los escasos cambios hemodinámicos observados en nuestro experimento.

Los efectos protectores del endotelio del esmolol continúan con el aumento de eNOS, llegando a niveles similares al grupo Sham y el descenso en iNOS. Esta expresión aumentada de eNOS inhibe la adhesión leucocitaria al endotelio vascular, resultando en conocidos efectos protectores vasculares.⁶⁹ iNOS, por otra parte tiene una fuerte asociación con la disfunción endotelial, comprobada en modelos experimentales de sepsis.²¹⁴

Este cambio beneficioso en el perfil de expresión de eNOS e iNOS puede a su vez explicar la mayor disponibilidad de NO observada en el grupo Esmolol. La reducción de biodisponibilidad de NO está relacionada con disfunción vascular,²¹⁵ y su presencia tiene conocidos efectos beneficiosos a nivel vascular, como la inhibición de la adhesión de leucocitos al endotelio o la agregación plaquetaria.²¹⁶

Nuestros resultados concuerdan con el estudio previamente realizado por Hillebrand con betabloqueantes β 1 selectivos, en este caso nevigolol, en los que se observa una mejoría en la función endotelial mediante mecanismos dependientes de NO.²¹⁷

Los resultados obtenidos en nuestro estudio pueden ser explicados mediante diferentes mecanismos. En primer lugar, la perfusión de esmolol redujo los niveles de NF κ B medidos en las biopsias, como ya demostró Wei en el contexto de shock séptico.¹⁶⁸ Este factor de transcripción, entre otras cosas, induce la expresión de iNOS por lo que su reducción dará lugar al descenso de iNOS.⁷²

En segundo lugar, TNF- α e IL-1 han demostrado tener la capacidad de reducir la expresión de eNOS y la producción de NO.²¹⁸ Por lo tanto la disminución de estas citoquinas observada en nuestro estudio podría favorecer la expresión de eNOS.

Un posible tercer factor para explicar los resultados puede ser un efecto antioxidante del esmolol, que como comentamos previamente comparte con otros betabloqueantes. Este efecto le permitiría evitar la oxidación de NO a ONOO⁻, de esta manera aumentando la biodisponibilidad del NO.^{219 220}

5. Respuesta inflamatoria hepática

En pacientes con hígados sanos, es frecuente una ligera la afectación de la función hepática durante el periodo intra o postoperatorio, manifestada por leves aumentos pasajeros en transaminasas, bilirrubina y fosfatasa alcalina, pero en muy pocas ocasiones se hace clínicamente relevante.²²¹ En cirugía torácica, los cambios hemodinámicos, la hipoxemia y el sangrado excesivo son los principales factores que predicen daño hepático postoperatorio,

aunque el riesgo de daño hepático significativo es comparativamente menor que en cirugía mayor abdominal.²²²

La ventilación unipulmonar ha demostrado causar daño a órganos remotos, especialmente el hígado, como ilustramos en la introducción. Estos mecanismos de lesión hepática se pueden producir mediante la producción de ROS, especialmente importante en el caso de isquemia-reperfusión,¹⁰⁷ así como de mediadores inflamatorios que pasan a la circulación sistémica y en última instancia llegan al hígado.^{108, 109} Yulug demostró que este daño hepático es directamente proporcional al tiempo de VUP.²²³

La importancia de la respuesta inflamatoria a nivel hepático en nuestro estudio, no obstante, no reside únicamente en el posible daño al parénquima hepático, sino en la capacidad del hígado para magnificar la respuesta inflamatoria pulmonar, como hemos observado previamente, produciendo una respuesta inflamatoria sistémica que a su vez aumenta el daño pulmonar.^{111, 112}

Los hallazgos de nuestro estudio vienen a confirmar, por un lado, que el efecto proinflamatorio producido por la VUP así como la resección pulmonar se va a traducir en una respuesta inflamatoria a nivel del hígado, amplificando la inflamación a nivel sistémico, como observamos por el aumento de las citoquinas inflamatorias así como de NFκB producido en el grupo Control respecto al Sham. Por otra parte, el tratamiento con esmolol demuestra reducir esta respuesta inflamatoria a nivel hepático, no solo observándose una atenuación de las vías proinflamatorias, sino también un menor deterioro comparativamente de las vías antiinflamatorias, representadas en este caso por IL-10, una citoquina antiinflamatoria con un importante papel a la hora de mantener la homeostasis inflamatoria en el hígado,^{102, 103} por lo que se mantiene un mejor balance pro/antiinflamatorio.

Existen varios mecanismos que pueden justificar este efecto. En primer lugar, tenemos que considerar los mecanismos antes citados que justifican la reducción de los mediadores

inflamatorios circulantes, ya que estos mediadores, como hemos observado, van a ser amplificados a nivel del hígado, por lo que menos mediadores circulantes conlleva una menor inflamación hepática.

En segundo lugar, Patterson estableció que la amplificación de la respuesta inflamatoria a nivel hepático está mediada por NFκB. Existen estudios previos demostrando que los betabloqueantes reducen la inflamación mediante la inhibición de NFκB, siendo este efecto debido a diferentes factores, incluyendo la supresión de la unión del NFκB a sus sitios de unión y al potencial antioxidante de este fármaco.²²⁴ Nuestros hallazgos, demostrando la reducción de este NFκB con la administración de esmolol van a favor de esta teoría. La reducción en este factor de transcripción es una de las causas que contribuye a explicar la mejora en la situación hemodinámica que produce el esmolol en situaciones de inflamación exacerbada como el shock séptico, ya que se ha demostrado que la inhibición de NFκB previene la regulación a la baja que se produce sobre los receptores α₁ adrenérgicos, receptores con efecto vasoconstrictor.²²⁵ Evitando la disfunción de estos receptores se puede mejorar la reactividad vascular y explica la mejor respuesta a catecolaminas en sepsis que produce el tratamiento con esmolol,¹⁶⁴ ya que ejercen su efecto sobre estos mismos receptores.

Existe un tercer factor a considerar, aunque en este caso la evidencia que lo respalda es menos robusta. Atendiendo al artículo de Miksa que introduce el concepto de la excitotoxicidad simpática a nivel del hígado, sabemos que la noradrenalina que llega al hígado por la circulación portal procedente del intestino puede jugar un papel importante a la hora de promover la respuesta inflamatoria a nivel hepático.¹⁴⁴ También sabemos por el ensayo de Mori que el tratamiento con esmolol tiene un efecto protector sobre la barrera intestinal en un modelo de sepsis, un efecto aparentemente mediado también por la inhibición de NFκB.¹⁷⁹ Este efecto del esmolol por lo tanto podría jugar un papel en esta relación intestino-hígado, reduciendo la influencia proinflamatoria del primero sobre el segundo.

Este efecto antiinflamatorio a nivel hepático del bloqueo β_1 fue comprobado por Ackland en su estudio con metoprolol en sepsis severa en ratas, ya mencionado previamente.¹⁷¹ Hasta donde hemos podido comprobar no existen estudios previos evaluando el efecto de los betabloqueantes sobre la respuesta inflamatoria perioperatoria a nivel hepático. Este efecto puede tener una importante trascendencia clínica ya que puede no solo disminuir el daño a distancia que produce en otros órganos el biotrauma pulmonar, sino a su vez contribuir a disminuir el círculo de retroalimentación inflamatoria que se establece entre hígado y pulmón, que exacerba la inflamación pulmonar.

6. Apoptosis

Diversos estudios han relacionado los betabloqueantes con la apoptosis. Betabloqueantes no selectivos como propranolol parecen tener un efecto proapoptótico en diversos estudios, si bien están en relación a células cancerosas.^{226 227} André comprobó experimentalmente que la estimulación β_2 tiene un efecto antiapoptótico a nivel hepático. En su estudio comprueba que el clenbuterol, un agonista β_2 , inhibe la apoptosis en hepatocitos murinos, pero este efecto se pierde al administrarse concomitantemente propranolol, que bloquearía estos receptores.²²⁸ Los betabloqueantes β_1 selectivos, a diferencia de los no selectivos, parecen tener un efecto antiapoptótico, aunque esto se ha comprobado principalmente en cardiomiocitos, donde el perfil cardioprotector de esta medicación y su efecto hemodinámico pueden resultar fundamentales.^{229 230}

En nuestro estudio se determinaron marcadores de la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis en las muestras hepáticas, componentes de la familia Bcl-2, siendo Bcl-2 una proteína antiapoptótica y el resto proapoptóticas. Observamos según nuestros resultados que la VUP y la cirugía de resección pulmonar producen un aumento de la actividad apoptótica en el hígado de la cual el tratamiento con esmolol protege parcialmente.

Los hallazgos de nuestro estudio, pese a concordar con el efecto antiapoptótico previamente objetivado, no se pueden explicar una vez más por los efectos cardiovasculares del fármaco, por lo que debemos explorar otras posibles vías de actuación.

Uno de los motivos que pueden explicar este efecto es la reducción en TNF α producida por el tratamiento con esmolol, ya que esta citoquina es uno de los factores extrínsecos más importantes a la hora de provocar apoptosis y ha demostrado inducir la apoptosis en los hepatocitos.^{231 232}

El segundo mecanismo que puede explicar este efecto es la inhibición de iNOS, ya sea a través de la reducción en NF κ B o por otro mecanismo, ya que la activación de iNOS y la producción de NO aumentada que ello conlleva son uno de los mecanismos que median el inicio de la apoptosis por la vía mitocondrial.²³³

Nuevamente debemos mencionar el papel antioxidante del fármaco como potencial contribuidor a este resultado ya que las ROS han demostrado tener un papel provocando la apoptosis por vía mitocondrial por su capacidad para inhibir la proteína antiapoptótica Bcl-2,²³⁴ por lo que la capacidad del esmolol de reducir los ROS a través del estímulo de la acción de moléculas *scaveger* puede motivar en parte este efecto antiapoptótico.

Tanto la inflamación como la apoptosis a nivel hepático están íntimamente ligados al fallo hepático y son una parte fundamental de la mayoría, si no todas, las patologías hepáticas. Con esto en mente, los fármacos con un efecto hepatoprotector, como el que hemos demostrado que posee el esmolol, pueden jugar un papel clave en la prevención e incluso tratamiento del fracaso hepático.²³⁵

Conclusiones

1. La ventilación unipulmonar y la cirugía de resección pulmonar indujeron una respuesta inflamatoria hepática y sistémica, así como una alteración en la función endotelial, en la integridad del glicocálix y una respuesta apoptótica en el parénquima hepático.
2. El tratamiento con esmolol redujo la respuesta inflamatoria hepática y sistémica producida por la ventilación unipulmonar y resección pulmonar.
3. El tratamiento con esmolol atenuó la alteración en la función endotelial y el daño al glicocálix producido en la cirugía de resección pulmonar.
4. El tratamiento con esmolol atenuó parcialmente la respuesta apoptótica hepática producida en esa cirugía.
5. La perfusión de esmolol a las dosis estudiadas no produjo cambios significativos desde el punto de vista hemodinámico y respiratorio en animales sanos.

Bibliografía

-
- ¹ Cavaillon JM. Once upon a time, inflammation. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2021 Apr 9;27:e20200147.
- ² Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Sep;32(9):2045-51.
- ³ Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014 Aug;105(2):141-50.
- ⁴ Brusselle G, Bracke K. Targeting immune pathways for therapy in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Am Thorac Soc*. 2014 Dec;11 Suppl 5:S322-8.
- ⁵ Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017 Dec 14;9(6):7204-7218
- ⁶ Kohl BA, Deutschman CS. The inflammatory response to surgery and trauma. *Curr Opin Crit Care*. 2006 Aug;12(4):325-32
- ⁷ Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Cooper-Smith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801-10.
- ⁸ Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140:805–820.
- ⁹ Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Capítulo 4 - Inmunidad innata, Abbas *Inmunología celular y molecular Séptima edición (2012)* 55-88.
- ¹⁰ Rossaint J, Zarbock A. Perioperative Inflammation and Its Modulation by Anesthetics. *Anesth Analg*. 2018 Mar;126(3):1058-1067
- ¹¹ Neoptolemos JP, Wood P, Everson NW, Bell PRF. Monocyte function following surgery in man. Increased number and stimulation of migration, phagocytosis and chemiluminescence following abdominal surgery. *145 Eur Surg Res* 1985; 17:215-20.
- ¹² Weiser TG, Regenbogen SE, Thompson KD, Haynes AB, Lipsitz SR, Berry WR, Gawande AA. An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. *Lancet*. 2008 Jul 12;372(9633):139-144.
- ¹³ Weiser TG, Haynes AB, Molina G, Lipsitz SR, Esquivel MM, Uribe-Leitz T, Fu R, Azad T, Chao TE, Berry WR, Gawande AA. Size and distribution of the global volume of surgery in 2012. *Bull World Health Organ*. 2016 Mar 1;94(3):201-209F.
- ¹⁴ Shenkin A, Fraser WD, Series J, Winstanley FP, McCartney AC, Burns HJ, et al. The serum interleukin 6 response to elective surgery. *Lymphokine Res* 1989 Summer;8(2):123–7.
- ¹⁵ Kolasiński W. Surgical site infections - review of current knowledge, methods of prevention. *Pol Przegl Chir*. 2018 Nov 6;91(4):41-47.

-
- ¹⁶ Mokart D, Capo C, Blache JL, Delpero JR, Houvenaeghel G, Martin C, et al. Early postoperative compensatory anti-inflammatory response syndrome is associated with septic complications after major surgical trauma in patients with cancer. *Br J Surg* 2002 Nov;89(11):1450–6.
- ¹⁷ Szczesny TJ, Slotwinski R, Stankiewicz A, Szczygiel B, Zaleska M, Kopacz M. Interleukin 6 and interleukin 1 receptor antagonist as early markers of complications after lung cancer surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007 Apr;31(4):719-24
- ¹⁸ Pipanmekaporn T, Bunchungmongkol N, Punjasawadwong Y, Lapisatepun W, Tantraworasin A, Saokaew S. A risk score for predicting respiratory complications after thoracic surgery. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2019 May;27(4):278-287
- ¹⁹ Coburn M, Fahlenkamp A, Zoremba N, Schaelte G. Postoperative cognitive dysfunction: Incidence and prophylaxis. *Anaesthesist*. 2010 Feb;59(2):177-84; quiz 185.
- ²⁰ Riedel B, Browne K, Silbert B. Cerebral protection: inflammation, endothelial dysfunction, and postoperative cognitive dysfunction. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2014 Feb;27(1):89-97
- ²¹ Xie G, Zhang W, Chang Y, Chu Q. Relationship between perioperative inflammatory response and postoperative cognitive dysfunction in the elderly. *Med Hypotheses*. 2009 Sep;73(3):402-3.
- ²² Tsimogiannis KE, Tellis CC, Tselepis AD et al. Toll-like receptors in the inflammatory response during open and laparoscopic colectomy for colorectal cancer. *Surg Endosc* 2011; Sep 5.
- ²³ Sido B, Teklote JR, Hartel M, et al. Inflammatory response after abdominal surgery. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004; 18:439-54
- ²⁴ Licker MJ, Widikker I, Robert J, Frey JG, Spiliopoulos A, Ellenberger C, Schweizer A, Tschopp JM. Operative mortality and respiratory complications after lung resection for cancer: impact of chronic obstructive pulmonary disease and time trends. *Ann Thorac Surg*. 2006 May;81(5):1830-7.
- ²⁵ Sakamoto K, Arakawa H, Mita S, Ishiko T, Ikei S, Egami H, Hisano S, Ogawa M. Elevation of circulating interleukin 6 after surgery: factors influencing the serum level. *Cytokine*. 1994 Mar;6(2):181-6.
- ²⁶ Yim AP, Wan S, Lee TW, Arifi AA: VATS lobectomy reduces cytokine responses compared with conventional surgery. *Ann Thorac Surg* 2000; 70:243-47.
- ²⁷ Paul S, Altorki NK, Sheng S, Lee PC, Harpole DH, Onaitis MW, Stiles BM, Port JL, D'Amico TA. Thoracoscopic lobectomy is associated with lower morbidity than open lobectomy: a propensity-matched analysis from the STS database. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010 Feb;139(2):366-78.
- ²⁸ Laudanski K. Quo Vadis Anesthesiologist? The Value Proposition of Future Anesthesiologists Lies in Preserving or Restoring Presurgical Health after Surgical Insult. *J Clin Med*. 2022 Feb 21;11(4):1135.

²⁹ Rancan L, Huerta L, Cusati G, Erquicia I, Isea J, Paredes SD, García C, Garutti I, Simón C, Vara E. Sevoflurane prevents liver inflammatory response induced by lung ischemia-reperfusion. *Transplantation*. 2014 Dec 15;98(11):1151-7.

³⁰ Garutti I, Rancan L, Simón C, Cusati G, Sanchez-Pedrosa G, Moraga F, Olmedilla L, Lopez-Gil MT, Vara E. Intravenous lidocaine decreases tumor necrosis factor alpha expression both locally and systemically in pigs undergoing lung resection surgery. *Anesth Analg*. 2014 Oct;119(4):815-828.

³¹ Avignon PD, Hendenstrom G, Hedman C.. Pulmonary complications in respirator patients. *Acta Med Scand Suppl*. 1956;316:86-90.

³² Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator-induced injury: from barotrauma to biotrauma. *Proc Assoc Am Physicians*. 1998 Nov-Dec;110(6):482-8.

³³ Lumb AB, Slinger P. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: physiology and anesthetic implications. *Anesthesiology*. 2015 Apr;122(4):932-46.

³⁴ Schilling T, Kozian A, Huth C, Bühling F, Kretzschmar M, Welte T, Hachenberg T. The pulmonary immune effects of mechanical ventilation in patients undergoing thoracic surgery. *Anesth Analg*. 2005 Oct;101(4):957-965.

³⁵ Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. 1974 149 Nov;110(5):556-65.

³⁶ Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. 1988 May;137(5):1159-64.

³⁷ Wilson MR, Choudhury S, Goddard ME, O'Dea KP, Nicholson AG, Takata M. High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol* (1985). 2003 Oct;95(4):1385-93.

³⁸ Hoegl S, Boost KA, Flondor M, Scheiermann P, Muhl H, Pfeilschifter J, Zwissler B, Hofstetter C. Short-term exposure to high-pressure ventilation leads to pulmonary biotrauma and systemic inflammation in the rat. *Int J Mol Med*. 2008 Apr;21(4):513-9.

³⁹ Haitisma JJ, Uhlig S, Göggel R, Verbrugge SJ, Lachmann U, Lachmann B. Ventilator-induced lung injury leads to loss of alveolar and systemic compartmentalization of tumor necrosis factor-alpha. *Intensive Care Med*. 2000 Oct;26(10):1515-22.

⁴⁰ Tusman G, Böhm SH, Sipmann FS, Maisch S. Lung recruitment improves the efficiency of ventilation and gas exchange during one-lung ventilation anesthesia. *Anesth Analg* 2004;98:1604–9

⁴¹ Duggan M, Kavanagh BP. Atelectasis in the perioperative patient. *Curr Opin Anaesthesiol* 2007;20:37–42

⁴² Olivant Fisher A, Husain K, Wolfson MR, Hubert TL, Rodriguez E, Shaffer TH, Theroux MC. Hyperoxia during one lung ventilation: inflammatory and oxidative responses. *Pediatr Pulmonol* 2012;47:979–86

⁴³ López-Aguilar J, Piacentini E, Villagrà A, Murias G, Pascotto S, Saenz-Valiente A, Fernández-Segoviano P, Hotchkiss JR, Blanch L. Contributions of vascular flow and pulmonary capillary pressure to ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 2006;34:1106–12

⁴⁴ Hotchkiss JR Jr, Blanch L, Naveira A, Adams AB, Carter C, Olson DA, Leo PH, Marini JJ. Relative roles of vascular and airspace pressures in ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 2001;29:1593–8

⁴⁵ Leite CF, Calixto MC, Toro IF, Antunes E, Mussi RK. Characterization of pulmonary and systemic inflammatory responses produced by lung re-expansion after one-lung ventilation. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2012;26:427–32

⁴⁶ 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

⁴⁷ Sánchez-Pedrosa G, Vara Ameigeiras E, Casanova Barea J, Rancan L, Simón Adiego CM, Garutti Martínez I. Role of surgical manipulation in lung inflammatory response in a model of lung resection surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2018 Dec 1;27(6):870-877.

⁴⁸ Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest*. 1997 Mar 1;99(5):944-52.

⁴⁹ Sugiura, M., P. R. McCulloch, S. Wren, R. H. Dawson, and A. B. Froese. Ventilator pattern influences neutrophil influx and activation in atelectasis-prone rabbit lung. *J. Appl. Physiol*. 1994. 77:1355–1365.

⁵⁰ Ito Y, Veldhuizen RA, Yao LJ, McCaig LA, Bartlett AJ, Lewis JF. Ventilation strategies affect surfactant aggregate conversion in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Feb;155(2):493-9.

⁵¹ Zingg U, Forberger J, Frey DM, Esterman AJ, Oertli D, Beck-Schimmer B, Zollinger A. Inflammatory response in ventilated left and collapsed right lungs, serum and pleural fluid, in transthoracic esophagectomy for cancer. *Eur Cytokine Netw*. 2010 Mar;21(1):50-7

⁵² Slutsky AS, Tremblay LN. Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor? *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Jun;157(6 Pt 1):1721-5.

⁵³ Tutor JD, Mason CM, Dobard E, Beckerman RC, Summer WR, Nelson S. Loss of compartmentalization of alveolar tumor necrosis factor after lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 May;149(5):1107-11.

⁵⁴ Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA*. 1999 Jul 7;282(1):54-61.

-
- ⁵⁵ Slutsky AS, Ranieri VM. Mechanical ventilation: lessons from the ARDSNet trial. *Respir Res.* 2000;1(2):73-7.
- ⁵⁶ Slutsky AS, Tremblay LN. Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor? *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Jun;157(6 Pt 1):1721-5. Review.
- ⁵⁷ Turunen R, Nupponen I, Siitonen S, Repo H, Andersson S. Onset of mechanical ventilation is associated with rapid activation of circulating phagocytes in preterm infants. *Pediatrics.* 2006 Feb;117(2):448-54.
- ⁵⁸ Kuiper JW, Groeneveld AB, Slutsky AS, Plötz FB. Mechanical ventilation and acute renal failure. *Crit Care Med.* 2005 Jun;33(6):1408-15.
- ⁵⁹ Guery BP, Welsh DA, Viget NB, et al. Ventilation-induced lung injury is associated with an increase in gut permeability. *Shock.* 2003;19(6):559-563.
- ⁶⁰ Michelet P, D'Journo XB, Roch A, Doddoli C, Marin V, Papazian L, Decamps I, Bregeon F, Thomas P, Auffray JP. Protective ventilation influences systemic inflammation after esophagectomy: a randomized controlled study. *Anesthesiology.* 2006 Nov;105(5):911-9.
- ⁶¹ Li X, Xue W, Zhang Q, Zhu Y, Fang Y, Huang J. Effect of Driving Pressure-Oriented Ventilation on Patients Undergoing One-Lung Ventilation During Thoracic Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Surg.* 2022 May 27;9:14984.
- ⁶² Puja M. Shah, Zachary C. Dietch, Robert G. Sawyer. Chapter 3 - The Inflammatory Response Sabiston Textbook of Surgery, Twentieth Edition (2016) 25-43.
- ⁶³ Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018 Jan;281(1):8-27.
- ⁶⁴ Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med.* 2020 Jan 6;217(1):e20190418.
- ⁶⁵ Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec;1(6):a001651.
- ⁶⁶ Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFkB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016 May;8(3):227-41.
- ⁶⁷ Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol.* 2021 Dec;101(Pt B):107598
- ⁶⁸ Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 2009;20:223–230.
- ⁶⁹ Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 1995;76:980–986.

-
- ⁷⁰ Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4651–4655.
- ⁷¹ Dimmeler S, Zeiher AM. Nitric oxide—an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* 1999;6:964–968.
- ⁷² Sun Z, Andersson R. NF-kappaB activation and inhibition: A review. *Shock* 2002; 18:99–106.
- ⁷³ Kröncke KD, Kolb-Bachofen V, Berschick B, Burkart V, Kolb H. Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175:752–758.
- ⁷⁴ Lange M, Enkhbaatar P, Nakano Y, Traber DL. Role of nitric oxide in shock: the large animal perspective. *Front Biosci* 2009;14:1979–1989.
- ⁷⁵ Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 2007; 454:345-359.
- ⁷⁶ Levick JR, Michel CC. Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. *Cardiovasc Res* 2010; 87:198-210.
- ⁷⁷ Weinbaum S, Zhang X, Han Y, Vink H, Cowin SC. Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:7988-7995.
- ⁷⁸ Zharikov SI, Sigova AA, Chen S, Bubb MR, Block ER. Cytoskeletal regulation of the l-arginine/NO pathway in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(3):L465–73.
- ⁷⁹ Lipowsky HH. The endothelial glycocalyx as a barrier to leukocyte adhesion and its mediation by extracellular proteases. *Ann Biomed Eng* 2012; 40:840-848.
- ⁸⁰ Iba T, Levy JH. Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis. *J Thromb Haemost* 2019; 17: 283–94.
- ⁸¹ Henry CB, Duling BR. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:2815-2823.
- ⁸² Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemiareperfusion injury. *Ann Vasc Surg* 2005; 19:572-584.
- ⁸³ Torres Filho I, Torres LN, Sondeen JL, Polykratis IA, Dubick MA. In vivo evaluation of venular glycocalyx during hemorrhagic shock in rats using intravital microscopy. *Microvasc Res* 2013; 85:128-133.
- ⁸⁴ Bruegger D, Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:H1993-1999.

-
- ⁸⁵ Zuurbier CJ, Demirci C, Koeman A, Vink H, Ince C. Short-term hyperglycemia increases endothelial glycocalyx permeability and acutely decreases lineal density of capillaries with flowing red blood cells. *J Appl Physiol* 2005; 99:1471-1476.
- ⁸⁶ Steppan J, Hofer S, Funke B, Brenner T, Henrich M, Martin E et al. Sepsis and major abdominal surgery lead to flaking of the endothelial glycocalyx. *J Surg Res* 2011; 165:136-141.
- ⁸⁷ Johansson PI, Stensballe J, Rasmussen LS, Ostrowski SR. A high admission syndecan-1 level, a marker of endothelial glycocalyx degradation, is associated with inflammation, protein C depletion, fibrinolysis, and increased mortality in trauma patients. *Ann Surg.* 2011 Aug;254(2):194-200.
- ⁸⁸ Schmidt EP, Yang Y, Janssen WJ, et al. The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. *Nat Med* 2012;18(8):1217–23.
- ⁸⁹ Eichenbaum KD, Neustein SM. Acute lung injury after thoracic surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2010 Aug;24(4):681-90.
- ⁹⁰ Monahan LJ. Acute respiratory distress syndrome. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2013;43(10):278–84.
- ⁹¹ Casanova J, Simon C, Vara E, Sanchez G, Rancan L, Abubakra S, Calvo A, Gonzalez FJ, Garutti I. Sevoflurane anesthetic preconditioning protects the lung endothelial glycocalyx from ischemia reperfusion injury in an experimental lung autotransplant model. *J Anesth.* 2016 Oct;30(5):755-62.
- ⁹² Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. 2007 The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9, 121–167.
- ⁹³ Puskarich MA, Cornelius DC, Tharp J, Nandi U, Jones AE. Plasma syndecan-1 levels identify a cohort of patients with severe sepsis at high risk for intubation after large-volume intravenous fluid resuscitation. *J Crit Care.* 2016 Dec;36:125-129.
- ⁹⁴ Gonzalez Rodriguez E, Ostrowski SR, Cardenas JC, Baer LA, Tomasek JS, Henriksen HH, Stensballe J, Cotton BA, Holcomb JB, Johansson PI, Wade CE. Syndecan-1: A Quantitative Marker for the Endotheliopathy of Trauma. *J Am Coll Surg.* 2017 Sep;225(3):419-427.
- ⁹⁵ Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516.
- ⁹⁶ Newmeyer DD, Bossy-Wetzel E, Kluck RM, Wolf BB, Beere HM, Green DR. Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ* 2000;7:402–7.
- ⁹⁷ Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995;80:285–91.
- ⁹⁸ Liu FT, Newland AC, Jia L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:956–62.

-
- ⁹⁹ Flores-Romero H, García-Sáez AJ. The Incomplete Puzzle of the BCL2 Proteins. *Cells*. 2019 Sep 29;8(10):1176
- ¹⁰⁰ Chwieralski CE, Welte T, Bühling F. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis*. 2006 Feb;11(2):143-9.
- ¹⁰¹ Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res*. 2010;87(2):300–10
- ¹⁰² Crispe, I.N. (2003) Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 51–62
- ¹⁰³ Saraiva, M. and O’Garra, A. (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 170–181,
- ¹⁰⁴ Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 2006; 26: 1175–1186.
- ¹⁰⁵ Protzer U, Maini MK, Knolle PA. Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12(3):201–13
- ¹⁰⁶ Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O. Effect of lung ischemia-reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;29:294–8.
- ¹⁰⁷ Huerta L, Rancan L, Simón C, Isea J, Vidaurre E, Vara E, Garutti I, González-Aragoneses F. Ischaemic preconditioning prevents the liver inflammatory response to lung ischaemia/reperfusion in a swine lung autotransplant model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2013 Jun;43(6):1194-201
- ¹⁰⁸ Markovic N, McCaig LA, Stephen J, Mizuguchi S, Veldhuizen RA, Lewis JF, Cepinkas G. Mediators released from LPS-challenged lungs induce inflammatory responses in liver vascular endothelial cells and neutrophilic leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009 Dec;297(6):G1066-76.
- ¹⁰⁹ Walker MG, Yao LJ, Patterson EK, Joseph MG, Cepinkas G, Veldhuizen RA, Lewis JF, Yamashita CM. The effect of tidal volume on systemic inflammation in Acid-induced lung injury. *Respiration*. 2011;81(4):333-42.
- ¹¹⁰ Moshage H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol* 1997; 181: 257–266
- ¹¹¹ Siore AM, Parker RE, Stecenko AA, Cuppels C, McKean M, Christman BW, Cruz-Gervis R, Brigham KL. Endotoxin-induced acute lung injury requires interaction with the liver. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Nov;289(5):L769-76
- ¹¹² Patterson EK, Yao LJ, Ramic N, Lewis JF, Cepinkas G, McCaig L, Veldhuizen RA, Yamashita CM. Lung-derived mediators induce cytokine production in downstream organs via an NF-κB-dependent mechanism. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:586895.

-
- ¹¹³ Wehrwein EA, Orer HS, Barman SM. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr Physiol*. 2016 Jun 13;6(3):1239-78.
- ¹¹⁴ Motiejunaite J, Amar L, Vidal-Petiot E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2021 Jun;82(3-4):193-197.
- ¹¹⁵ Meltzer SJ, Meltzer C: On a difference in the influence upon inflammation between the section of the sympathetic nerve and the removal of the sympathetic ganglion. *J Med Res* 1903, 10:135–141.
- ¹¹⁶ Nance DM, Sanders VM: Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987–2007). *Brain Behav Immun* 2007, 21:736–745.
- ¹¹⁷ Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA: Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 1986, 233:652–654.
- ¹¹⁸ Goehler LE, Relton JK, Dripps D, Kiechle R, Tartaglia N, Maier SF, Watkins LR: Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication. *Brain Res Bull* 1997, 43:357–364.
- ¹¹⁹ Zielinski MR, Dunbrasky DL, Taishi P, Souza G, Krueger JM: Vagotomy attenuates brain cytokines and sleep induced by peripherally administered tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide in mice. *Sleep* 2013, 36:227–1238. 1238A.
- ¹²⁰ Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS, Olschowki JA, Livnat S: Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev* 1987, 100:225–260.
- ¹²¹ Carr DJJ, Blalock JE: Neuropeptide hormones and receptors common to the immune and neuroendocrine systems: bidirectional pathway of intersystem communication. In *Psychoneuroimmunology*. 2nd edition. Edited by Ader R, Felten DL, Cohen N. San Diego: Academic Press, Inc; 1991:573–588.
- ¹²² Lee TP, Szeffler S, Ellis EF. Beta-adrenergic receptors of human polymorphonuclear leukocytes. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1981;31:453–62.
- ¹²³ Kohm, A. P., & Sanders, V. M. (2000). Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. *Immunology Today*, 21(11), 539–542.
- ¹²⁴ Kox M, van Eijk LT, Zwaag J, van den Wildenberg J, Sweep FC, van der Hoeven JG, Pickkers P. Voluntary activation of the sympathetic nervous system and attenuation of the innate immune response in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 May 20;111(20):7379-84.
- ¹²⁵ Pöyhönen-Alho MK, Manhem K, Katzman P, Kibarskis A, Antikainen RL, Erkkola RU, Tuomilehto JO, Ebeling PE, Kaaja RJ: Central sympatholytic therapy has anti-inflammatory properties in hypertensive postmenopausal women. *J Hypertens* 2008, 26:2445–2449.
- ¹²⁶ Bellocchi C, Carandina A, Montinaro B, Targetti E, Furlan L, Rodrigues GD, Tobaldini E, Montano N. The Interplay between Autonomic Nervous System and Inflammation across Systemic Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 23;23(5):2449.

-
- ¹²⁷ Severn, A.; Rapson, N.T.; A Hunter, C.; Liew, F.Y. Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and beta-adrenergic agonists. *J. Immunol.* 1992, 148
- ¹²⁸ Hetier, E.; Ayala, J.; Bousseau, A.; Prochiantz, A. Modulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression by beta-adrenergic agonists in mouse ameboid microglial cells. *Exp. Brain Res.* 1991, 86
- ¹²⁹ van der Poll, T.; Jansen, J.; Endert, E.; Sauerwein, H.P.; van Deventer, S.J. Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infect. Immun.* 1994, 62, 2046–2050
- ¹³⁰ Nicholls, A.J.; Wen, S.W.; Hall, P.; Hickey, M.; Wong, C.H.Y. Activation of the sympathetic nervous system modulates neutrophil function. *J. Leukoc. Biol.* 2017, 103, 295–309
- ¹³¹ Weiss M, Schneider EM, Tarnow J, et al. Is inhibition of oxygen radical production of neutrophils by sympathomimetics mediated via beta-2 adrenoceptors? *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;278(3):1105-1113.
- ¹³² Suberville, S.; Bellocq, A.; Fouqueray, B.; Philippe, C.; Lantz, O.; Perez, J.; Baud, L. Regulation of interleukin-10 production by β -adrenergic agonists. *Eur. J. Immunol.* 1996, 26, 2601–2605.
- ¹³³ Oberbeck R, Schmitz D, Wilsenack K, Schüler M, Pehle B, Schedlowski M, Exton MS. Adrenergic modulation of survival and cellular immune functions during polymicrobial sepsis. *Neuroimmunomodulation.* 2004;11(4):214-23.
- ¹³⁴ Sanders VM, Straub RH. Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav Immun.* 2002 Aug;16(4):290-332.
- ¹³⁵ Shakhar, G.; Ben-Eliyahu, S. In vivo beta-adrenergic stimulation suppresses natural killer activity and compromises resistance to tumor metastasis in rats. *J. Immunol.* 1998, 160, 3251–3258
- ¹³⁶ Das, P., M. Zhou, S. M. Goyert, H. H. Simms & P. Wang: Upregulation of Kupffer cell (KC) α 2A-adrenoceptor (AR) plays an important role in TNF- α release in sepsis. *Shock*, 2004, 21, 30
- ¹³⁷ Grisanti LA, Evanson J, Marchus E, Jorissen H, Woster AP, DeKrey W, Sauter ER, Combs CK, Porter JE. Pro-inflammatory responses in human monocytes are beta1-adrenergic receptor subtype dependent. *Mol Immunol.* 2010 Mar;47(6):1244-54.
- ¹³⁸ Liu, K.; Yang, L.; Wang, G.; Liu, J.; Zhao, X.; Wang, Y.; Li, J.; Yang, J. Metabolic Stress Drives Sympathetic Neuropathy within the Liver. *Cell Metab.* 2021, 33, 666–675.e4.
- ¹³⁹ Nobin, A.; Baumgarten, H.G.; Falck, B.; Ingemansson, S.; Moghimzadeh, E.; Rosengren, E. Organization of the Sympathetic Innervation in Liver Tissue from Monkey and Man. *Cell Tissue Res.* 1978, 195, 371–380.
- ¹⁴⁰ Kjaer, M.; Jurlander, J.; Keiding, S.; Galbo, H.; Kirkegaard, P.; Hage, E. No Reinnervation of Hepatic Sympathetic Nerves after Liver Transplantation in Human Subjects. *J. Hepatol.* 1994, 20, 97–100.

-
- ¹⁴¹ Yang, S.; Zhou, M.; Chaudry, I.H.; Wang, P. Norepinephrine-Induced Hepatocellular Dysfunction in Early Sepsis Is Mediated by Activation of Alpha2-Adrenoceptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001, 281, G1014–G1021.
- ¹⁴² Sancho-Bru P, Bataller R, Colmenero J, Gasull X, Moreno M, Arroyo V, Brenner DA, Ginès P. Norepinephrine induces calcium spikes and proinflammatory actions in human hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 Nov;291(5):G877-84.
- ¹⁴³ Zhou, M.; Das, P.; Simms, H.H.; Wang, P. Gut-Derived Norepinephrine Plays an Important Role in up-Regulating IL-1beta and IL-10. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, 1740, 446–452.
- ¹⁴⁴ Miksa M, Wu R, Zhou M, Wang P. Sympathetic excitotoxicity in sepsis: pro-inflammatory priming of macrophages by norepinephrine. *Front Biosci.* 2005 Sep 1;10:2217-29.
- ¹⁴⁵ Yang, S.; Koo, D.J.; Zhou, M.; Chaudry, I.H.; Wang, P. Gut-Derived Norepinephrine Plays a Critical Role in Producing Hepatocellular Dysfunction during Early Sepsis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000, 279, G1274–G1281.
- ¹⁴⁶ Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest.* 2007 Feb;117(2):289-96.
- ¹⁴⁷ Borovikova, L.V.; Ivanova, S.; Zhang, M.; Yang, H.; Botchkina, G.I.; Watkins, L.R.; Wang, H.; Abumrad, N.; Eaton, J.W.; Tracey, K.J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000, 405, 458–462.
- ¹⁴⁸ Rosas-Ballina, M.; Olofsson, P.S.; Ochani, M.; Valdés-Ferrer, S.I.; Levine, Y.A.; Reardon, C.; Tusche, M.W.; Pavlov, V.A.; Andersson, U.; Chavan, S.; et al. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science* 2011, 334, 98–101.
- ¹⁴⁹ Kawashima, K. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol. Ther.* 2000, 86, 29–48.
- ¹⁵⁰ Frishman WH, Saunders E. β -Adrenergic blockers. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2011 Sep;13(9):649-53.
- ¹⁵¹ Macchia A, Romero M, Comignani PD, Mariani J, D'Ettoire A, Prini N, Santopinto M, Tognoni G. Previous prescription of β -blockers is associated with reduced mortality among patients hospitalized in intensive care units for sepsis. *Crit Care Med.* 2012 Oct;40(10):2768-72
- ¹⁵² Tan K, Harazim M, Simpson A, Tan YC, Gunawan G, Robledo KP, Whitehead C, Tang B, Mclean A, Nalos M. Association Between Premorbid Beta-Blocker Exposure and Sepsis Outcomes-The Beta-Blockers in European and Australian/American Septic Patients (BEAST) Study. *Crit Care Med.* 2021 Sep 1;49(9):1493-1503.
- ¹⁵³ Cotton BA, Snodgrass KB, Fleming SB, Carpenter RO, Kemp CD, Arbogast PG, Morris JA Jr. Beta-blocker exposure is associated with improved survival after severe traumatic brain injury. *J Trauma.* 2007 Jan;62(1):26-33; discussion 33-5.

-
- ¹⁵⁴ Khalili H, Ahl R, Paydar S, Sjolin G, Cao Y, Abdolrahimzadeh Fard H, Niakan A, Hanna K, Joseph B, Mohseni S. Beta-Blocker Therapy in Severe Traumatic Brain Injury: A Prospective Randomized Controlled Trial. *World J Surg.* 2020 Jun;44(6):1844-1853
- ¹⁵⁵ Wallace AW, Au S, Cason BA. Association of the pattern of use of perioperative β -blockade and postoperative mortality. *Anesthesiology* 2010; 113: 794e805
- ¹⁵⁶ Devereaux PJ, Yang H, Yusuf S, et al. Effects of extended-release metoprolol succinate in patients undergoing noncardiac surgery (POISE trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 371: 1839e47
- ¹⁵⁷ Ficha técnica de Brevibloc 10mg/ml. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Jul 2018.
- ¹⁵⁸ Gelineau AM, King MR, Ladha KS, Burns SM, Houle T, Anderson TA. Intraoperative Esmolol as an Adjunct for Perioperative Opioid and Postoperative Pain Reduction: A Systematic Review, Meta-analysis, and Meta-regression. *Anesth Analg.* 2018 Mar;126(3):1035-1049.
- ¹⁵⁹ Fu L, Yu B, Li Z, Liu Z. The therapeutic potential of ultra-short-acting β -receptor antagonists in perioperative analgesic: Evidence from preclinical and clinical studies. *Front Pharmacol.* 2022 Oct 11;13:914710.
- ¹⁶⁰ Fumagalli C, Maurizi N, Marchionni N, Fornasari D. β -blockers: Their new life from hypertension to cancer and migraine. *Pharmacol Res.* 2020 Jan;151:104587.
- ¹⁶¹ Sakamoto A, Yagi K, Okamura T, Harada T, Usuda J. Perioperative Administration of an Intravenous Beta-Blocker Landiolol Hydrochloride in Patients with Lung Cancer: A Japanese Retrospective Exploratory Clinical Study. *Sci Rep.* 2019 Mar 26;9(1):5217.
- ¹⁶² Haldar R, Ricon I, Cole S, Zmora O, Ben-Eliyahu S. Perioperative beta-adrenergic blockade and COX2 inhibition in colorectal cancer patients improves pro-metastatic indices in the excised tumor: EMT, tumor infiltrating lymphocytes (TILs), and gene regulatory pathways. *Brain, Behavior, and Immunity* 2017; 66: e9.
- ¹⁶³ Suzuki T, Morisaki H, Serita R, Yamamoto M, Kotake Y, Ishizaka A, Takeda J. Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats. *Crit Care Med.* 2005 Oct;33(10):2294-301.
- ¹⁶⁴ Kimmoun A, Louis H, Al Kattani N, Delemazure J, Dessales N, Wei C, Marie PY, Issa K, Levy B. β 1-Adrenergic Inhibition Improves Cardiac and Vascular Function in Experimental Septic Shock. *Crit Care Med.* 2015 Sep;43(9):e332-40.
- ¹⁶⁵ Hernández G, Tapia P, Alegría L, Soto D, Luengo C, Gomez J, Jarufe N, Achurra P, Rebolledo R, Bruhn A, Castro R, Kattan E, Ospina-Tascón G, Bakker J. Effects of dexmedetomidine and esmolol on systemic hemodynamics and exogenous lactate clearance in early experimental septic shock. *Crit Care.* 2016 Aug 2;20(1):234.
- ¹⁶⁶ Gorre F, Vandekerckhove H. Beta-blockers: focus on mechanism of action. Which beta-blocker, when and why? *Acta Cardiol.* 2010 Oct;65(5):565-70.

¹⁶⁷ Kumar A, Thota V, Dee L, et al: Tumor necrosis factor- α and interleukin 1 α are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183:949–958

¹⁶⁸ Wei C, Louis H, Schmitt M, Albuisson E, Orłowski S, Levy B, Kimmoun A. Effects of low doses of esmolol on cardiac and vascular function in experimental septic shock. *Crit Care*. 2016 Dec 21;20(1):407.

¹⁶⁹ Kurosawa S, Kanaya N, Niiyama Y, Nakayama M, Fujita S, Namiki A. Landiolol, esmolol and propranolol protect from ischemia/reperfusion injury in isolated guinea pig hearts. *Can J Anaesth*. 2003; 50:489-94

¹⁷⁰ Daga MK, Chaudhary M, Sharma B, Bhattacharjee J, Ghambhir DS, Arora N, Sudha R. Effect of esmolol on oxidant status and antioxidant activity in acute myocardial infarction. *J Assoc Physicians India*. 2003 Jul;51:677-80

¹⁷¹ Ackland GL, Yao ST, Rudiger A, Dyson A, Stidwill R, Poputnikov D, Singer M, Gourine AV. Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. *Crit Care Med*. 2010;38:388–94.

¹⁷² Kim YS, Kang SH, Song KY, Cho ML, Her YM, Huh JW, Lee J. The immunomodulatory role of esmolol in patients undergoing laparoscopic gastrectomy due to gastric cancer. *Anaesthesia*. 2013 Sep;68(9):924-30.

¹⁷³ Kim Y, Hwang W, Cho ML, Her YM, Ahn S, Lee J. The effects of intraoperative esmolol administration on perioperative inflammatory responses in patients undergoing laparoscopic gastrectomy: a dose-response study. *Surg Innov*. 2015 Apr;22(2):177-82.

¹⁷⁴ Sheppard D, DiStefano S, Byrd RC, Eschenbacher WL, Bell V, Steck J, Laddu A. Effects of esmolol on airway function in patients with asthma. *J Clin Pharmacol*. 1986 Mar;26(3):169-74.

¹⁷⁵ Salpeter S, Ormiston T, Salpeter E. Cardioselective beta-blockers for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005 Oct 19;2005(4):CD003566.

¹⁷⁶ Röth E, Török B. Effect of the ultrashort-acting beta-blocker Brevibloc on free-radical-mediated injuries during the early reperfusion state. *Basic Res Cardiol*. 1991 Sep-Oct;86(5):422-33.

¹⁷⁷ Gore DC, Wolfe RR. Hemodynamic and metabolic effects of selective beta1 adrenergic blockade during sepsis. *Surgery*. 2006 May;139(5):686-94.

¹⁷⁸ Fannelop T, Dahle GO, Matre K, Moen CA, Mongstad A, Eliassen F, Segadal L, Grong K. Esmolol before 80 min of cardiac arrest with oxygenated cold blood cardioplegia alleviates systolic dysfunction. An experimental study in pigs. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008 Jan;33(1):9171

¹⁷⁹ Mori K, Morisaki H, Yajima S, Suzuki T, Ishikawa A, Nakamura N, Innami Y, Takeda J. Beta-1 blocker improves survival of septic rats through preservation of gut barrier function. *Intensive Care Med*. 2011 Nov;37(11):1849-56.

-
- ¹⁸⁰ Morelli A, Ertmer C, Westphal M, Rehberg S, Kampmeier T, Ligges S, Orecchioni A, D'Egidio A, D'Ippoliti F, Raffone C, Venditti M, Guarracino F, Girardis M, Tritapepe L, Pietropaoli P, Mebazaa A, Singer M. Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: a randomized clinical trial.
- ¹⁸¹ Ibrahim-Zada I, Rhee P, Gomez CT, Weller J, Friese RS. Inhibition of sepsis-induced inflammatory response by β 1-adrenergic antagonists. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014 Feb;76(2):320-7; discussion 327-8.
- ¹⁸² Shang X, Wang K, Xu J, Gong S, Ye Y, Chen K, Lian F, Chen W, Yu R. The Effect of Esmolol on Tissue Perfusion and Clinical Prognosis of Patients with Severe Sepsis: A Prospective Cohort Study. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1038034
- ¹⁸³ Du W, Wang XT, Long Y, Liu DW. Efficacy and Safety of Esmolol in Treatment of Patients with Septic Shock. *Chin Med J (Engl)*. 2016 Jul 20;129(14):1658-65.
- ¹⁸⁴ Zhang L, Nie Y, Zheng Y, Ke L, Tong Z, Li W, Li J. Esmolol attenuates lung injury and inflammation in severe acute pancreatitis rats. *Pancreatol*. 2016 Sep-Oct;16(5):726-32.
- ¹⁸⁵ Lu Y, Yang Y, He X, Dong S, Wang W, Wang D, Zhang P. Esmolol reduces apoptosis and inflammation in early sepsis rats with abdominal infection. *Am J Emerg Med*. 2017 Oct;35(10):1480-1484.
- ¹⁸⁶ Guo CA, Ma L, Su XL, Wang YZ, Zhen LL, Zhang B, An H, Liu HB. Esmolol inhibits inflammation and apoptosis in the intestinal tissue via the overexpression of NF- κ B-p65 in the early stage sepsis rats. *Turk J Gastroenterol*. 2020 Apr;31(4):331-341.
- ¹⁸⁷ Cocchi MN, Dargin J, Chase M, Patel PV, Grossestreuer A, Balaji L, Liu X, Moskowitz A, Berg K, Donnino MW. Esmolol to Treat the Hemodynamic Effects of Septic Shock: A Randomized Controlled Trial. *Shock*. 2022 Apr 1;57(4):508-517.
- ¹⁸⁸ Martín Vivas A, Saboya Sánchez S, Patiño Rodríguez M, Silva Obregón JA, Gómez Rosado S, Blanco García JJ. Monitorización hemodinámica: sistema PiCCO. *Enferm Intensiva*. 2008 Jul-Sep;19(3):132-40.
- ¹⁸⁹ Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85
- ¹⁹⁰ Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
- ¹⁹¹ Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
- ¹⁹² Jachs M, Hartl L, Schaufler D, Desbalmes C, Simbrunner B, Eigenbauer E, Bauer DJM, Paternostro R, Schwabl P, Scheiner B, Bucsics T, Stättermayer AF, Pinter M, Trauner M, Mandorfer M, Reiberger T. Amelioration of systemic inflammation in advanced chronic liver disease upon beta-blocker therapy translates into improved clinical outcomes. *Gut*. 2021 Sep;70(9):1758-1767.

-
- ¹⁹³ Sessler DI, Khanna AK. Perioperative myocardial injury and the contribution of hypotension. *Intensive Care Med.* 2018 Jun;44(6):811-822.
- ¹⁹⁴ Maheshwari K, Turan A, Mao G, Yang D, Niazi AK, Agarwal D, Sessler DI, Kurz A. The association of hypotension during non-cardiac surgery, before and after skin incision, with postoperative acute kidney injury: a retrospective cohort analysis. *Anaesthesia.* 2018 Oct;73(10):1223-1228.
- ¹⁹⁵ Zhang XK, Hu Q, Chen QH, Wang WX. The effect of continuous perfusion of esmolol on cardiovascular risk in elderly patients undergoing noncardiac surgery. *Pharmazie.* 2017 Aug 1;72(8):487-489.
- ¹⁹⁶ Dransfield MT, Rowe SM, Johnson JE, Bailey WC, Gerald LB. Use of beta blockers and the risk of death in hospitalised patients with acute exacerbations of COPD. *Thorax.* 2008 Apr;63(4):301-5.
- ¹⁹⁷ Wiest DB, Haney JS. Clinical pharmacokinetics and therapeutic efficacy of esmolol. *Clin Pharmacokinet.* 2012 Jun 1;51(6):347-56.
- ¹⁹⁸ Salpeter SR, Ormiston TM, Salpeter EE. Cardioselective β -blockers in patients with reactive airway disease: A meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2002; 137: 715- 25.
- ¹⁹⁹ Yamakage M, Iwasaki S, Jeong SW, Satoh J, Namiki A. Beta-1 selective adrenergic antagonist landiolol and esmolol can be safely used in patients with airway hyperreactivity. *Heart Lung.* 2009 Jan-Feb;38(1):48-55.
- ²⁰⁰ Nguyen LP, Omoluabi O, Parra S, Frieske JM, Clement C, Ammar-Aouchiche Z, Ho SB, Ehre C, Kesimer M, Knoll BJ, Tuvim MJ, Dickey BF, Bond RA. Chronic exposure to beta-blockers attenuates inflammation and mucin content in a murine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 Mar;38(3):256-62.
- ²⁰¹ Bhatt SP, Wells JM, Kinney GL, Washko GR Jr, Budoff M, Kim YI, Bailey WC, Nath H, Hokanson JE, Silverman EK, Crapo J, Dransfield MT; COPD Gene Investigators. β -Blockers are associated with a reduction in COPD exacerbations. *Thorax.* 2016 Jan;71(1):8-14.
- ²⁰² Gulea C, Zakeri R, Alderman V, Morgan A, Ross J, Quint JK. Beta-blocker therapy in patients with COPD: a systematic literature review and meta-analysis with multiple treatment comparison. *Respir Res.* 2021 Feb 23;22(1):64.
- ²⁰³ Rezvanfar MA, Saeedi S, Mansoori P, Saadat S, Goosheh M, Shojaei Saadi HA, Baeeri M, Abdollahi M. Dual targeting of TNF- α and free radical toxic stress as a promising strategy to manage experimental polycystic ovary. *Pharm Biol.* 2016;54(1):80-90.
- ²⁰⁴ Tan S, Zhou F, Zhang Z, Wang J, Xu J, Zhuang Q, Meng Q, Xi Q, Jiang Y, Wu G. Beta-1 blocker reduces inflammation and preserves intestinal barrier function after open abdominal surgery. *Surgery.* 2021 Apr; 169(4):885-893.
- ²⁰⁵ Xu L, Yu WK, Lin ZL, Tan SJ, Bai XW, Ding K, Li N. Impact of β -adrenoceptor blockade on systemic inflammation and coagulation disturbances in rats with acute traumatic coagulopathy. *Med Sci Monit.* 2015 Feb 12;21:468-76.

²⁰⁶ Durand M, Hagimont E, Louis H, Asfar P, Fripiat JP, Singer M, Gauchotte G, Labat C, Lacolley P, Levy B, Glenn Chousterman B, Kimmoun A. The β 1 -Adrenergic Receptor Contributes to Sepsis-Induced Immunosuppression Through Modulation of Regulatory T-Cell Inhibitory Function. *Crit Care Med*. 2022 Sep 1;50(9):e707-e718.

²⁰⁷ Nishina K, Akamatsu H, Mikawa K, Shiga M, Obara H, Niwa Y. A comparison of atenolol, labetalol, esmolol, and landiolol for altering human neutrophil functions. *Anesth Analg*. 2001;93:641---4.

²⁰⁸ Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, Reichart B, Peter K, Becker BF. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation*. 2007 Oct 23;116(17):1896-906.

²⁰⁹ Jacquet-Lagrèze M, Allaouchiche B, Restagno D, Paquet C, Ayoub JY, Etienne J, Vandenesch F, Dauwalder O, Bonnet JM, Junot S. Gut and sublingual microvascular effect of esmolol during septic shock in a porcine model. *Crit Care*. 2015 Jun 4;19(1):241.

²¹⁰ Schmidt EP, Yang Y, Janssen WJ, Gandjeva A, Perez MJ, Barthel L, Zemans RL, Bowman JC, Koyanagi DE, Yunt ZX, Smith LP, Cheng SS, Overdier KH, Thompson KR, Geraci MW, Douglas IS, Pearse DB, Tuder RM. The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. *Nat Med*. 2012 Aug;18(8):1217-23.

²¹¹ Joffre J, Hellman J. Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Sepsis and Acute Inflammation. *Antioxid Redox Signal*. 2021 Nov 20;35(15):1291-1307.

²¹² Bai K, Wang W. Shear stress-induced redistribution of the glycocalyx on endothelial cells in vitro. *Biomech Model Mechanobiol*. 2014 Apr;13(2):303-11.

²¹³ Chen SL, Hu ZY, Zhang JJ, Ye F, Kan J, Xu T, Liu ZZ, Zhang YJ, Zhang JX, Chen M. Acute effects of nicardipine and esmolol on the cardiac cycle, intracardiac hemodynamic and endothelial shear stress in patients with unstable angina pectoris and moderate coronary stenosis: results from single center, randomized study. *Cardiovasc Ther*. 2012 Jun;30(3):162-71.

²¹⁴ Chauhan SD, Seggara G, Vo PA, Macallister RJ, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *FASEB J*. 2003 Apr;17(6):773-5.

²¹⁵ Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA. Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation in human microvasculature. Diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 2001;103:1752–1758.

²¹⁶ Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*. 1997;100:2153–2157.

²¹⁷ Hillebrand U, Lang D, Telgmann RG, Hagedorn C, Reuter S, Kliche K, Stock CM, Oberleithner H, Pavenstädt H, Büsselmaker E, Hausberg M. Nebivolol decreases endothelial cell stiffness via the estrogen receptor beta: a nano-imaging study. *J Hypertens*. 2009 Mar;27(3):517-26.

-
- ²¹⁸ Kiss H, Schneeberger C, Tschugguel W, Lass H, Huber JC, Husslein P, Knöfler M. Expression of endothelial (type III) nitric oxide synthase in cytotrophoblastic cell lines: regulation by hypoxia and inflammatory cytokines. *Placenta*. 1998 Nov;19(8):603-11.
- ²¹⁹ Janero DR, Lopez R, Pittman J, et al. Propranolol as xanthine oxidase inhibitor: implications for antioxidant activity. *Life Sci*. 1989;44:1579–1588.
- ²²⁰ Funovic P, Korda M, Kubant R, Barlag RE, Jacob RF, Mason RP, Malinski T. Effect of beta-blockers on endothelial function during biological aging: a nanotechnological approach. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008 Feb;51(2):208-15.
- ²²¹ Pratt DS and Kaplan MM. Evaluation of abnormal liver enzyme results in asymptomatic patients. *New Engl J Med* 2000; 342: 1266–1271.
- ²²² Dabir S, Mohammad-Taheri Z, Parsa T, Abbasi-Nazari M, Radpay B, Radmand G. Effects of propofol versus isoflurane on liver function after open thoracotomy. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2015 Mar;23(3):292-8.
- ²²³ Yuluğ E, Tekinbas C, Ulusoy H, Alver A, Yenilmez E, Aydin S, Cekiç B, Topbas M, Imamoğlu M, Arvas H. The effects of oxidative stress on the liver and ileum in rats caused by one-lung ventilation. *J Surg Res*. 2007 May 15;139(2):253-60
- ²²⁴ Yang SP, Ho LJ, Lin YL, Cheng SM, Tsao TP, Chang DM, Hsu YL, Shih CY, Juan TY, Lai JH. Carvedilol, a new antioxidative beta-blocker, blocks in vitro human peripheral blood T cell activation by downregulating NF-kappaB activity. *Cardiovasc Res*. 2003 Sep 1;59(3):776-87.
- ²²⁵ Schmidt C, Kurt B, Höcherl K, et al: Inhibition of NF-kappaB activity prevents downregulation of alpha1-adrenergic receptors and circulatory failure during CLP-induced sepsis. *Shock* 2009; 32:239–246
- ²²⁶ Wang F, Liu H, Wang F, Xu R, Wang P, Tang F, Zhang X, Zhu Z, Lv H, Han T. Propranolol suppresses the proliferation and induces the apoptosis of liver cancer cells. *Mol Med Rep*. 2018 Apr;17(4):5213-5221.
- ²²⁷ Koh M, Takahashi T, Kurokawa Y, Kobayashi T, Saito T, Ishida T, Serada S, Fujimoto M, Naka T, Wada N, Yamashita K, Tanaka K, Miyazaki Y, Makino T, Nakajima K, Yamasaki M, Eguchi H, Doki Y. Propranolol suppresses gastric cancer cell growth by regulating proliferation and apoptosis. *Gastric Cancer*. 2021 Sep;24(5):1037-1049.
- ²²⁸ André C, Couton D, Gaston J, Erraji L, Renia L, Varlet P, Briand P, Guillet JG. beta2-adrenergic receptor-selective agonist clenbuterol prevents Fas-induced liver apoptosis and death in mice. *Am J Physiol*. 1999 Mar;276(3):G647-54.
- ²²⁹ Ahmet I, Krawczyk M, Heller P, Moon C, Lakatta EG, Talan MI. Beneficial effects of chronic pharmacological manipulation of beta-adrenoreceptor subtype signaling in rodent dilated ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2004 Aug 31;110(9):1083-90.
- ²³⁰ Fiordaliso F, De Angelis N, Bai A, Cuccovillo I, Salio M, Serra DM, Bianchi R, Razzetti R, Latini R, Masson S. Effect of beta-adrenergic and renin-angiotensin system blockade on myocyte apoptosis and oxidative stress in diabetic hypertensive rats. *Life Sci*. 2007 Sep 1;81(12):951-9.

²³¹ Ross K, Rudel T, Kozjak-Pavlovic V. TOM-independent complex formation of Bax and Bak in mammalian mitochondria during TNFalpha-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2009 May;16(5):697-707.

²³² Eguchi A, Wree A, Feldstein AE. Biomarkers of liver cell death. *J Hepatol.* 2014 May;60(5):1063-74.

²³³ I. H. Chae, K. W. Park, H. S. Kim and B. H. Oh, Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells, *Clin. Chim. Acta*, 2004, 341, 83–91.

²³⁴ Cantara S, Donnini S, Giachetti A, Thorpe PE, Ziche M. Exogenous BH4/Bcl-2 peptide reverts coronary endothelial cell apoptosis induced by oxidative stress. *J Vasc Res.* 2004 Mar-Apr;41(2):202-7.

²³⁵ Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol.* 2013 Sep;59(3):583-94.