

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**Respuesta inflamatoria local secundaria a la ventilación unipulmonar
en un modelo experimental de cirugía torácica.
Efecto modulador del sevoflurano**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Guillermo Sánchez Pedrosa

Directores

**Elena Vara Ameigeiras
Ignacio Garutti Martínez
Carlos Simón Adiego**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**RESPUESTA INFLAMATORIA LOCAL SECUNDARIA
A LA VENTILACIÓN UNIPULMONAR EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE CIRUGÍA TORÁCICA.
EFECTO MODULADOR DEL SEVOFLURANO.**

Guillermo Sánchez Pedrosa

Bajo la dirección de los doctores:

**Elena Vara Ameigeiras
Ignacio Garutti Martínez
Carlos Simón Adiego**



Elena Vara, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular, Carlos María Simón Adiego, Profesor Asociado y FEA del Departamento de Cirugía (Servicio de Cirugía Torácica del HGUGM), Facultad de Medicina de la UCM e Ignacio Garutti, FEA del Servicio de Anestesiología del HGUGM,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “**Respuesta inflamatoria local secundaria a la ventilación unipulmonar en un modelo experimental de cirugía torácica. Efecto modulador del sevoflurano**” del que es autor D. Guillermo Sánchez Pedrosa, ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Guillermo Sánchez Pedrosa ha participado activamente con nosotros en diferentes proyectos de investigación subvencionados por el Ministerio de Ciencia e Innovación, enfocados al estudio de los mecanismos moleculares implicados en la posible modulación del daño pulmonar secundario a la cirugía de resección pulmonar. La participación en estos proyectos le ha permitido realizar una serie de actividades experimentales, conducentes a la obtención del Grado Académico de Doctor. En este período ha obtenido una serie de logros y resultados que se han materializado hasta la fecha en su participación en diversos congresos científicos de la especialidad, tanto nacionales como internacionales, donde se han presentado los resultados de su trabajo. Además es coautor de 3 publicaciones en revistas de alto impacto en el área de la anestesiología. Por todo ello, consideramos que el trabajo realizado reúne las características necesarias de originalidad, planteamiento adecuado de la hipótesis de trabajo, desarrollo metodológico adecuado y discusión crítica de los resultados para ser defendida como tesis doctoral.

Madrid, a 24 de Abril de 2015

Fdo.: E. Vara

C. Simón

I. Garutti

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento:

- A la Dra. Elena Vara Ameigeiras, catedrática del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Complutense de Madrid, por su paciencia y estímulo constante, y por toda la ayuda y soporte necesario sin el cual no hubiera sido posible la realización de este tesis doctoral.

- Al Dr. Ignacio Garutti Martínez, Médico Adjunto de Anestesiología y Reanimación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, por contar conmigo para este proyecto y porque su inquietud y capacidad de trabajo han sido una referencia constante durante estos años.

- Al Dr. Carlos Simón Adiego, Médico adjunto de Cirugía Torácica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, por todos sus consejos y porque su dedicación y exigencia han sido una guía fundamental para la realización de este proyecto.

- Al Dr. Francisco González Moraga, amigo y compañero desde el inicio en este proyecto, que ha sido un modelo y un apoyo insustituible durante estos años.

- A la Dra. Lisa Rancan, por toda su ayuda para la realización del proyecto, y por abrirme las puertas del laboratorio de Bioquímica.

- A todos los residentes y estudiantes que han participado en este proyecto por las horas compartidas, y sin los cuales nada hubiera sido posible.

- A D. Vicente de Moya, el maestro del que más aprendí, por su dedicación incondicional a una enseñanza integral.

A mis padres, por enseñarme a pensar y a recorrer cualquier camino.

A mi hermano, por ser referencia y ayuda constante.

A mi familia, por su tiempo y sus consejos fundamentales.

A mis amigos, por estar siempre cerca.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ALI: Daño pulmonar agudo (*Del inglés: Acute lung injury*).

BAD: Promotor de muerte asociado a Bcl-2 (*Del inglés: Bcl.2 Associated Death promoter*).

BAX-: Proteína X asociada a Bcl-2 (Bcl-2 Associated X protein).

BCL-2: Proteína derivada del proto-oncogén Bcl-2 (*Del inglés: B-Cell Lymphoma 2*).

CO₂: Dióxido de carbono.

CRP: Cirugía de resección pulmonar.

DPA: Daño pulmonar agudo.

ELWI: Índice de agua extravascular pulmonar (*Del inglés: extravascular lung water index*).

ERN: Especies reactivas de nitrógeno.

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

FADD: Proteína asociada a Fas con dominio efector de muerte (*Del inglés: Fas-associated protein with death domain*).

iCAD : Inhibidor de la DNasa activado por caspasas.

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular (*Del inglés: Intercellular Adhesion Molecule*).

IL-1: Interleuquina-1.

JNK: Quinasa C-Jun N-Terminal.

LBA: Lavado broncoalveolar.

LMD: Lóbulo mediastínico (derecho).

LPIR: Lesión pulmonar por isquemia-reperfusión.

LRS: Cirugía de resección pulmonar (*Del inglés: Lung resection surgery*).

LSI: Lóbulo superior izquierdo.

MAC: Canal mitocondrial inducido por la apoptosis (*Del inglés: mitochondrial apoptosis-induced channel*).

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos.

mRNA: ARN mensajero.

MiRNA: Micro RNA (Micro ácido ribonucleico).

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

O₂: Oxígeno.

OLV. Ventilación unipulmonar (*Del inglés: One lung ventilation*).

PARP: Poli ADPribosa polimerasa.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Del inglés: Polymerase Chain Reaction*)

PEEP: Presión positiva al final de la espiración (*Del inglés: positive end expiratory pressure*)

SDRA: Síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

SIR: Síndrome isquemia-reperfusión.

SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

sTNF- α : TNF- α soluble.

sTNF- α R: Receptor del TNF- α soluble.

TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa (*Del inglés: Tumoral Necrosis Factor - Alpha*).

VATS: Cirugía toracoscópica video-asistida (*Del inglés: Video-Assisted Thoracoscopic Surgery*).

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (*Del inglés: Vascular Endothelial Growth Factor*).

VILI: Lesión inducida por la ventilación mecánica (*Del inglés: Ventilator Induced Lung Injury*).

VPH: Vasoconstricción pulmonar hipóxica.

VT: Volumen corriente (del inglés: volumen tydall).

WB: Técnica de inmunoblot o electrotransferencia (*Del inglés: Western-Blot*).

INDICE

➤ RESUMEN / SUMMARY:	10 / 19
➤ INTRODUCCIÓN	27
1) DAÑO PULMONAR AGUDO EN CIRUGÍA DE RESECCIÓN	
<u>PULMONAR</u>	27
1.1) DEFINICIÓN Y RELEVANCIA	27
1.2) FISIOPATOLOGÍA:	32
▪ 1.2.a) VENTILACIÓN MECÁNICA	34
▪ 1.2.b) VENTILACIÓN UNIPULMONAR	37
▪ 1.2.c) SÍNDROME ISQUEMIA-REPERFUSIÓN	41
▪ 1.2.d) MANIPULACIÓN QUIRÚRGICA	42
2) <u>MARCADORES BIOLÓGICOS DEL DAÑO PULMONAR AGUDO</u>	45
2.1) RESPUESTA INFLAMATORIA: Neutrófilos y Citoquinas	45
▪ 2.1.a) Interleuquina-1	49
▪ 2.1.b) TNF-α	50
▪ 2.1.c) ICAM-1	51
2.2) GLICOCALIX ENDOTELIAL: Syndecan-1	52
2.3) APOPTOSIS	54
▪ 2.2.a) Caspasas	55
▪ 2.2.b) Sistema Bcl-2	59
▪ 2.2.c) Apoptosis y Daño pulmonar agudo	60
2.4) MICRORNAS	64
2.5) EDEMA PULMONAR	68
3) <u>SEVOFLURANO</u>	70

➤ <u>HIPÓTESIS</u>	75
➤ <u>OBJETIVOS</u>	75
➤ <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	77
1) Modelo Animal y grupos de estudio.....	77
2) Protocolo anestésico.....	78
3) Protocolo quirúrgico.....	81
4) Mediciones realizadas.	82
4.1) Parámetros hemodinámicos y gasometrías arteriales.....	83
4.2) Biopsias pulmonares.	84
➤ <u>ESTADÍSTICA</u>	89
➤ <u>RESULTADOS</u>	90
1) Parámetros hemodinámicos y gasométricos.....	90
2) Biopsias pulmonares.	93
- Citoquinas proinflamatoria.	93
- Glicocálix.....	99
- Edema pulmonar.....	101
- Apoptosis.....	102
- Expresión de microRNAs.....	107
➤ <u>DISCUSIÓN</u>	112
1) Respuesta inflamatoria en la cirugía de resección pulmonar.	112
2) Influencia de la ventilación unipulmonar.....	116
3) Influencia de la manipulación quirúrgica.....	118
4) Efecto del Sevoflurano.....	120
➤ <u>CONCLUSIONES</u>	126
➤ <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	127

RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

El daño pulmonar agudo secundario a la cirugía de resección pulmonar (CRP) afecta en torno al 3-4% de los pacientes sometidos a este procedimiento. A pesar de no resultar una entidad excesivamente frecuente, condiciona en gran medida el pronóstico de los pacientes sometidos a estas técnicas quirúrgicas, resultando la principal causa de mortalidad.

En la etiopatogenia de esta entidad clínica intervienen distintos factores como son la ventilación mecánica, la ventilación unipulmonar (OLV), los procesos de isquemia-reperusión y la manipulación quirúrgica asociada al procedimiento. Estos factores colaboran de forma intercurrente a desencadenar una respuesta inflamatoria secundaria que lesiona el epitelio y endotelio alveolar, ocasionando una alteración de la permeabilidad de la barrera alveolocapilar, y la consiguiente formación de edema en los espacios alveolares.

Hace años que se conoce que la ventilación mecánica puede provocar lesiones tisulares y edema pulmonar no cardiogénico en pulmones sanos, derivado de una respuesta inflamatoria secundaria a los distintos estímulos que condiciona la ventilación mecánica. En los procedimientos de CRP, la OLV del pulmón declive (o dependiente) implica una especial agresión al pulmón, con mayor posibilidad de lesión por volumen y presión. Así mismo, la posición declive de este pulmón (dado el posicionamiento en

decúbito lateral), implica mayor perfusión por efecto gravitatorio y la compresión de las porciones basales y externas con la mesa quirúrgica.

El colapso del pulmón no dependiente, que es sometido al procedimiento quirúrgico, implica el desarrollo de atelectasias alveolares, isquemia parcial por la vasoconstricción pulmonar hipóxica (a pesar de la circulación dual pulmonar-bronquial) y posterior síndrome isquemia-reperfusión con la finalización de la OLV. Por último, la manipulación quirúrgica de un órgano delicado como es el pulmón puede condicionar una lesión parenquimatosa similar a una contusión pulmonar.

Los distintos estímulos agresivos que actúan sobre el tejido pulmonar durante los procedimientos de resección pulmonar condicionan una respuesta inflamatoria secundaria. Esta respuesta inflamatoria se asocia a la activación de la muerte celular programada (apoptosis) y a la degradación de glicocálix endotelial.

Para estudiar estos procesos podemos valorar la expresión de determinadas moléculas que van a funcionar como marcadores biológicos de la respuesta inflamatoria asociada. Los estímulos nocivos sobre el tejido pulmonar provocan la activación de neutrófilos y macrófagos, y la secreción de citoquinas por parte de estas células. Las citoquinas más estudiadas dentro de los procesos de inflamación pulmonar son TNF- α , IL-1, o ICAM-1. La integridad del glicocálix endotelial se encuentra directamente relacionada con la expresión en membrana del proteoglicano Syndecan-1.

Tanto las agresiones celulares, como también el TNF- α , pueden activar los procesos de apoptosis, que se encuentran también muy implicados en el desarrollo del daño pulmonar agudo. El estudio de expresión de las distintas proteínas reguladores de la apoptosis (Caspasas, sistema BCL-2), permite valorar el grado de activación de este proceso.

Por otro lado, la regulación de la expresión génica en los procesos inflamatorios se encuentra condicionada por la actividad de los MicroRNAs (MiRNAs). Estas cadenas de ácido ribonucleico controlan la expresión y silenciamiento post-transcripcional de distintos genes. Su implicación en los procesos inflamatorios hace que sean de interés en el estudio de la respuesta inflamatoria asociada a los procedimientos de CRP.

El Sevoflurano es un agente volátil habitualmente utilizado para el mantenimiento anestésico en multitud de procedimientos quirúrgicos. La capacidad del Sevoflurano para atenuar las respuesta inflamatorias, derivado de su capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria ha sido estudiada en relación a la CRP con resultados contradictorios. Nuestro grupo en estudios previos ya ha descrito un efecto protector de este inhalatorio en un modelo de isquemia-reperfusión pulmonar.

Por otro lado, la respuesta local y sistémica asociada a la CRP con OLV ha sido previamente estudiada. Sin embargo, según nuestro conocimiento, los efectos segregados de la OLV y manipulación quirúrgica no han sido descritos hasta la fecha.

HIPÓTESIS:

La CRP con OLV condiciona una respuesta inflamatoria local, que provoca una lesión orgánica con aumento del grado de edema pulmonar. La ventilación unipulmonar, el colapso y re-expansión pulmonar, y la manipulación quirúrgica son los principales factores etiológicos de dicha respuesta inflamatoria. El Sevoflurano administrado durante la cirugía podría atenuar esa respuesta inflamatoria.

OBJETIVOS:

Objetivo General: Evaluar un posible efecto inmunomodulador del Sevoflurano sobre la respuesta inflamatoria local secundaria a la cirugía de resección pulmonar.

Otros Objetivos específicos: Evaluar la influencia aislada de ventilación unipulmonar en la respuesta inflamatoria; Evaluar la influencia del procedimiento quirúrgico sobre la respuesta inflamatoria; Evaluar la degradación del glicocálix endotelial tras la CRP; Evaluar la implicación de los MicroRNAs en la respuesta inflamatoria.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo aleatorizado realizado en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y en el Laboratorio de Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Veinte cerdos de la raza mini-pig fueron sometidos a una toracotomía izquierda. Se dividieron en 4 grupos de 5 animales cada uno:

- Grupo **SHAM-A**: Toracotomía + Anestesia con Propofol (NO OLV)
- Grupo **SHAM-B**: Toracotomía + Anestesia con Propofol + OLV.
- Grupo **CONTROL**: Toracotomía + CRP + Anestesia con Propofol + OLV
- Grupo **SEVO**: Toracotomía + CRP + Anestesia con Sevoflurano + OLV

La CRP consistió en la realización de una lobectomía caudal izquierda, con una duración de OLV de 120 minutos.

A la finalización del procedimiento se procede a la educción anestésica y extubación. A las 24 horas, los animales fueron trasladados nuevamente al quirófano para la extracción de muestras pulmonares y su sacrificio. Las muestras pulmonares se extraen el primer día del lóbulo inferior izquierdo, mientras que a las 24 horas son extraídas del lóbulo superior izquierdo y del lóbulo mediastínico derecho.

En las biopsias de tejido pulmonar se analizaron distintos parámetros bioquímicos como el estudio del edema pulmonar según la relación peso húmedo/peso seco; ICAM-1 e Syndecan-1 por ELISA; IL-1, TNF- α , Caspasa-3 BAX, BAD y BCL-2 por Western-Blot; TNF- α e IL-1 por PCR y análisis de la expresión de MicroRNAs mediante el Kit de aislamiento mirVana.

ESTADÍSTICA:

Los cuatro grupos del estudio (CON, SEVO, SHAM-A, SHAM-B) fueron comparados de acuerdo a los parámetros hemodinámicos, gasometrías arteriales y análisis de las muestras recogidas de tejido pulmonar. Cada parámetro fue analizado de forma separada. En las muestras de tejido pulmonar, cada lóbulo fue comparado por separado. Para identificar las diferencias significativas entre los grupos se utilizó el Test de Kruskal-Wallis (la hipótesis nula fue rechazada para un valor de $\alpha=0,05$). Posteriormente para analizar los pares de muestras específicos y encontrar diferencias significativas fue usado el Test de Mann-Whitney. La significación estadística fue establecida con $P \leq 0,05$.

RESULTADOS:

Los valores hemodinámicos y gasométricos no mostraron alteraciones significativas entre los distintos grupos de estudio a lo largo del proceso.

El grupo Sham-B presentó mayores valores de TNF- α , IL-1 y BAD respecto al grupo Sham-A a las 24 horas de estudio. Esta elevación se produjo de manera simétrica en ambos pulmones.

Al comparar los valores de los grupos Control y Sevo con el grupo Sham-B, podemos observar como la CRP provocó un aumento de los parámetros inflamatorios (TNF- α , IL-1 e ICAM-1) a las 24 horas en ambos pulmones. Los marcadores pro apoptóticos (BAX, BAD y Caspasa-3) también se elevaron con procedimiento quirúrgico. Tanto los parámetros inflamatorios como apoptóticos se elevaron en mayor medida en el pulmón izquierdo, sometido a la CRP. La CRP también indujo un descenso significativo de BCL-2 y Syndecan-1. Los miRNAs mir-145 y mir-182 se

elevaron como consecuencia del procedimiento quirúrgico, sin que se observaran cambios en la expresión del resto de miRNAs. La CRP provocó un aumento significativo del grado de edema pulmonar según la relación peso húmedo/ peso seco en ambos pulmones.

Al observar las diferencias entre el grupo Control y el grupo Sevo, vemos como la utilización de Sevoflurano provocó una atenuación en la elevación de los parámetros proinflamatorios (TNF- α , IL-1, ICAM-1) y proapoptóticos (Caspasa-3, BAX, BAD) en comparación al grupo Control. El grupo tratado con Sevoflurano también presentó un descenso significativamente menor en los valores de Bcl-2 y Syndecan-1. Así mismo, indujo una atenuación en el grado de edema pulmonar en ambos lados. El grupo Sevo presenta valores significativamente menores de MiRNA-182 respecto al grupo Control.

DISCUSIÓN:

Es conocido que la OLV por sí misma supone una concatenación de estímulos nocivos para el pulmón y condiciona en parte el desarrollo de una respuesta inflamatoria secundaria con daño pulmonar agudo postoperatorio. Al comparar los valores de los grupos Sham-A y Sham-B, podemos observar como la OLV de 120 minutos es capaz, de forma aislada, de desencadenar una respuesta inflamatoria y apoptótica que afecta de manera simétrica a ambos pulmones, y que es objetivable en el tejido pulmonar a las 24 horas del procedimiento. Estas alteraciones no se han traducido en un mayor grado de edema pulmonar.

Al observar los valores de los grupos Control y Sevo respecto a Sham-B, podemos observar como en este modelo experimental de CRP el procedimiento quirúrgico condiciona un aumento asimétrico en la producción local de mediadores inflamatorios y proapoptóticos a las 24 horas, este aumento se asocia a su vez a un

aumento del grado de edema pulmonar. Los cambios observados en los parámetros inflamatorios se producen de forma semejante, con una mayor elevación en el pulmón izquierdo que ha sido sometido al procedimiento quirúrgico. Así mismo, el descenso en la expresión de Syndecan-1 en las membranas celulares, reflejo de la alteración en la regulación de la permeabilidad endotelial se produce en ambos lados pero en mayor medida en el pulmón izquierdo. También la activación de la apoptosis se produce de forma asimétrica, observando una mayor elevación de los marcadores en el caso del pulmón izquierdo. Estos resultados traducen un efecto de la CRP, independientemente de la OLV pero sumada a ésta, que provoca una respuesta proinflamatoria y proapoptótica secundaria de forma más acusada a nivel del pulmón sometido a la manipulación quirúrgica. La CRP no ha condicionado, a pesar del aumento del edema pulmonar, cambios en los valores gasométricos ni hemodinámicos. Es probable que con un periodo de estudio más prolongado, los cambios observados en las muestras pulmonares tuvieran un correlato gasométrico.

Como vemos, probablemente la OLV y manipulación quirúrgica sean las dos principales noxas intercurrentes que tienen lugar durante la CRP, y por lo tanto la respuesta inflamatoria y apoptótica observada resulte de la interacción de ambas.

Por otro lado, si analizamos la comparación de los dos grupos sometidos a la CRP (Control y Sevo), podemos observar como el mantenimiento anestésico con Sevoflurano induce una atenuación en la respuesta inflamatoria y apoptótica. Así mismo, mantiene en niveles más elevados la expresión de Syndecan-1 en las membranas celulares. Este efecto anti-inflamatorio y a favor del mantenimiento de la normal regulación de la permeabilidad endotelial es congruente con la protección que se observa respecto al edema pulmonar observado. Esta investigación es congruente con el papel protector del Sevoflurano que este grupo había observado respecto al SIR

pulmonar y lleva a pensar en un posible papel de este inhalatorio en los procedimientos de cirugía de resección pulmonar.

De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer estudio experimental que aísla los efectos de la ventilación unipulmonar y la manipulación quirúrgica sobre la respuesta inflamatoria y apoptótica asociada a la cirugía de resección pulmonar.

CONCLUSIONES:

- En nuestro modelo experimental en cerdos, la cirugía de resección pulmonar aumenta la expresión de mediadores de la inflamación y la apoptosis a las 24 horas, además provoca cierto grado de daño tisular en forma de edema pulmonar.

- En este modelo experimental la anestesia inhalatoria con sevoflurano durante la cirugía de resección pulmonar, disminuye el edema pulmonar, la expresión de mediadores inflamatorios y pro apoptóticos a las 24 horas del procedimiento quirúrgico.

- La cirugía de resección pulmonar provoca una degradación del glicocáliz endotelial a las 24 horas. Este efecto se atenúa con la administración del Sevoflurano.

- La cirugía de resección pulmonar induce cambios en el patrón de expresión de MicroRNAs reguladores, que se atenúan con la administración del Sevoflurano.

- La ventilación unipulmonar intraoperatoria condiciona una activación inflamatoria y pro-apoptótica en ambos pulmones, sin que ello repercuta en el grado de edema pulmonar en el intervalo de tiempo estudiado.

- La manipulación quirúrgica per sé, provoca una respuesta inflamatoria adicional que afecta a ambos pulmones, condicionando la aparición de edema pulmonar.

SUMMARY

INTRODUCTION:

Lung resection surgery (LRS) is still considered as a moderate or high-risk procedure. Respiratory complications are now considered as the main cause of early mortality after LRS and their incidence varies from 3 to 4% with no decrease observed in recent years.

Several etiologic factors are involved in the pathogenesis of lung injury. Surgical manipulation of a fragile organ, such as the lung, may result in alterations comparable to pulmonary contusion, which can promote an inflammatory response and cause parenchymal injury. Likewise, one lung ventilation (OLV) originates an adverse stimulus that affects both lungs. The greater airway pressure, higher oxygen concentrations and increased perfusion due to the contralateral hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) affect the dependent lung during OLV, whereas the non-dependent lung undergoes ischemia-reperfusion (I/R) phenomena due to HPV.

It has been previously observed that increased levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and TNF- α) are associated with lung injury in LRS and an early increase in the local production of cytokines has been observed in patients who later developed a clinically relevant acute lung injury (ALI). In both esophagectomy and LRS, the associated inflammatory response is greater than the one observed in other surgical procedures like abdominal surgery. Since OLV is a common in esophagectomy

and LRS, it has been suggested that it could play an important role in the inflammatory reaction in these scenarios. This would explain also the injury suffered by the dependent lung, not exposed to a surgical aggression, which in some studies is even greater than the one suffered by the nondependent lung. The duration of OLV and airway pressures involved during it, have also been associated with an inflammatory response that in combination with the activation of apoptosis and direct damage to epithelial and endothelial cells, also contribute to generate lung injury. Thus, OLV triggers a secondary acute inflammatory response, which damages the alveolar epithelium and endothelium and cause permeability alterations of the endothelial barrier and subsequent passage of high molecular weight proteins and the accumulation of edema in the alveolar spaces.

The inflammatory activation, and the use of mechanical ventilation can also activate pro-apoptotic pathways causing an additional injury and increasing the associated inflammatory response. Recent studies suggested that the endothelial glycocalyx could play an important role in the regulation of hydrodynamics and permeability, and so controlling the extravasation of neutrophils to alveolar spaces. Loss of some constituent proteins of glycocalyx, as Syndecan-1, can reflect the integrity of its structure and has been associated with the inflammatory response. Finally the regulation of gene expression in inflammatory processes is conditioned by the activity of microRNAs (miRNAs). These strands of ribonucleic acid (RNA) control the expression and post-transcriptional silencing of several genes. Their involvement in inflammatory processes makes them of interest in the study of the inflammatory response associated with LRS procedures

The ability of sevoflurane to attenuate the inflammatory response has been observed in lung ischemia-reperfusion injury and in LRS with conflicting results.

Previous studies from our group have described a protective effect of sevoflurane in a model of lung ischemia-reperfusion injury. Moreover, the local and systemic inflammatory response that occurs during LRS with OLV has also been studied. However, in our knowledge, the segregated effects of OLV and surgical manipulation have not been elucidated yet.

HYPOTHESIS:

LRS with OLV promotes a local inflammatory response that causes lung injury with alveolar edema. OLV, lung collapse and re-expansion and surgical manipulation are the main etiologic factors involved in this inflammatory response. Anesthetic maintenance with sevoflurano could attenuate this response

GOALS OF THE STUDY:

Primary goal: Evaluate the effect of sevoflurane in the inflammatory response associated to LRS.

Secondary goals: Evaluate the segregated influence of OLV in the inflammatory response to LRS; Evaluate the segregated influence of surgical manipulation on the inflammatory response to LRS; Evaluate the degradation of endothelial glycocalyx after LRS; To asses the involvement of miRNAs in the inflammatory response to LRS.

MATERIALS AND METHODS:

Prospective randomized study conducted at the Department of Experimental Medicine and Surgery at the Gregorio Marañón University Hospital and at the Laboratory of Molecular Biology III, Faculty of Medicine at the Complutense University of Madrid

Twenty “mini-pig” breed pigs weighting 35 ± 7 Kg were randomly assigned to 4 groups of 5 individuals:

- **SHAM-A group:** Thoracotomy + Propofol anesthesia (NO OLV)
- **SHAM-B group:** Thoracotomy + Propofol anesthesia + OLV.
- **CONTROL group:** Thoracotomy + LRS + Propofol anesthesia + OLV
- **SEVO group:** Thoracotomy + LRS + sevoflurane anesthesia + OLV

LRS consisted on performing a left caudal lobectomy, with OLV lasting 120 minutes.

At the end of the procedure the animals were awoken. 24 hours later, they were again taken to the operating room for collecting of lung samples and sacrifice. Lung samples were extracted on the first day of the left caudal lobe, whereas at 24 hours were extracted from left upper lobe and right mediastinal lobe.

In biopsies of lung tissue various biochemical parameters were analyzed: the study of pulmonary edema were analyzed by wet / dry ratio; Syndecan -1 and ICAM -1 by ELISA; IL -1, TNF - α , Caspase -3 BAX, BAD and BCL -2 by Western blot; TNF- α and IL-1 by PCR and the analysis of miRNAs expression by the isolation with mirVana kit.

STATISTICS:

The 4 groups (SHAM-A, SHAM-B, CON, and SEVO) were compared for lung tissue samples. Each parameter was analyzed separately. In lung tissue, right mediastinal lobe and left upper lobe values were compared separately. The Kruskal-Wallis test was used to identify any significant difference among the groups (the null hypothesis was rejected with an α value = 0.05). Then the Mann-Whitney U test was used to analyze the specific sample pairs for significant differences. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$. All data were expressed as mean \pm standard deviation.

RESULTS:

Hemodynamic and blood gas values remained very stable during the procedure and the day after surgery and no differences were observed among the groups.

A higher expression of TNF- α , IL-1 and BAD were observed in the biopsies of both lungs of SHAM-B group compared to those of SHAM-A group.

Considering Control and Sevo groups versus SHAM-B group, we could observe that LRS boosted an increase in inflammatory response (TNF- α , IL-1 and ICAM-1) 24 hours after surgery in both lungs. Pro-apoptotic mediators (BAX, BAD and Caspase-3) also increased with LRS. Both inflammatory and pro-apoptotic markers had a higher expression in the left lung. In addition, in control group, a decreased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and Syndecan-1 was observed. MiRNAs 145 and 182 were elevated as a consequence of LRS, but without observing any change in the other MiRNAs measured. LRS caused significant lung edema in both lungs according to wet/dry ratio.

Sevoflurane group exhibited an attenuation of the inflammatory (TNF- α , IL-1, ICAM-1) and apoptotic (BAX, BAD, Caspase-3) responses compared to Control group, and a significantly smaller decline in the levels of Syndecan-1 and Bcl-2. Besides, sevoflurane minimized lung edema bilaterally. MiRNA 182 levels were significantly lower in sevoflurane group compared to Control group.

DISCUSSION:

As we can see, some inflammatory (IL-1 and TNF- α) and apoptotic (BAD) mediators were increased in the Sham-B group (not undergone the procedure of lung resection but ventilate with OLV) compared to Sham-A group. Our results suggest that the OLV *per se* has an influence on the activation of pro-inflammatory and pro-apoptotic processes in both lungs. These finding is consistent with previous research that linked lung ischemia-reperfusion injury, coupled to OLV, with activation of inflammation and apoptosis. However, this is the first time that an experimental study about the inflammatory response linked to LRS isolates the effect of OLV.

Regarding the effect of LRS in Control group, compared to Sham-B group, it can be seen an increase in the production of pro-inflammatory and pro-apoptotic local mediators 24 hours after the surgical procedure. This increase was associated with the presence of pulmonary edema, reflecting the lung damage that occurs as a result. In our study, the levels of syndecan-1 were reduced after LRS, and this alteration was evident in greater degree in the non-dependent lung. In the samples where glycocalyx degradation was observed, also an increased pulmonary edema was evident. Hence, our results probably reflect that endothelial glycocalyx degradation is a key event in the pathogenesis of alveolar edema.

Moreover, the results of our work show that the non-dependent lung is more intensively affected by LRS. This asymmetric response is not observed in Sham-B group, as a result of the effect of OLV. So, surgical manipulation probably triggers an additional inflammatory response that adds to the effect of OLV and affects both lungs, but more intensively the non-dependent lung. LRS has not conditioned changes in oxygenation and hemodynamics that might be expected at 24 hours of the procedure, despite the increase in pulmonary edema. We believe it is likely that with a longer period of observation, the molecular changes and lung edema observed, had a gasometric observable correlation.

Sevoflurane has shown a protective effect with respect to lung edema, production of pro-inflammatory and pro-apoptotic factors. Probably, as a consequence of the protective effect of sevoflurane in relation to inflammation, apoptosis is indirectly hampered. Moreover, in our study, the administration of sevoflurane was able to maintain syndecan-1 levels similar to those of Sham groups, reflecting a protective effect of sevoflurane not only in relation to the inflammatory response, but also in relation to the maintenance of the glycocalyx integrity.

This research confirms our previous research regarding the protective role of sevoflurane on the local inflammatory response and apoptosis associated to lung ischemia-reperfusion injury. However we believe this is one of the first researches that segregate the effects of OLV and surgical manipulation on the inflammatory response linked to LRS.

CONCLUSIONS:

- In our model, lung resection surgery increases the expression of inflammation and apoptosis mediators, and it also causes some degree of tissue damage in the form of pulmonary edema.

- Inhalational anesthesia with sevoflurane reduces the pulmonary edema and the expression of inflammatory and apoptotic alterations within 24 hours of surgery.

- Lung resection surgery causes endothelial glycocalyx degradation at 24 hours. This effect is attenuated with Sevoflurane administration.

- Lung resection surgery promotes changes in the expression pattern of regulators microRNAs that are attenuated with the administration of sevoflurane .

- Our results prove that intraoperative OLV *per se*, causes an activation of inflammatory and apoptotic pathways in both lungs, without affecting the degree of pulmonary edema in the time interval of the study.

- Surgical manipulation promotes an additional inflammatory response that affects predominantly non-dependent lung.

INTRODUCCIÓN

1) DAÑO PULMONAR AGUDO EN CIRUGIA DE RESECCIÓN PULMONAR

1.1 DEFINICIÓN Y RELEVANCIA

El daño pulmonar agudo (DPA, o ALI por sus siglas en inglés: *acute lung injury*), o su manifestación más extrema conocida como SDRA (*síndrome de dificultad respiratoria del adulto*), se considera actualmente como una complicación de una amplia variedad de procesos médicos o quirúrgicos, donde únicamente algunos de ellos están en relación directa con el pulmón.

La primera descripción de esta entidad clínica, y la denominación de SDRA, se hace en 1967 por parte de Ashbaugh para describir el fallo respiratorio agudo, con edema pulmonar no cardiogénico, que objetivó en 12 pacientes de una unidad de cuidados intensivos, con patologías muy diversas[1]. Ya en 1984 Zeldin acuñó el término de “edema pulmonar post-neumonectomía” para describir el hallazgo de una lesión pulmonar en 10 pacientes sometidos a la resección completa de un pulmón [2]. Posteriormente se ha podido observar como la presencia de este tipo de lesión pulmonar no precisa de resecciones tan amplias y puede aparecer después de lobectomías pulmonares e incluso con resecciones de menor tejido, observándose en torno al 3-4% de los pacientes sometidos a cirugía de resección pulmonar (CRP) [3]. También se le ha denominado posteriormente “edema de alta permeabilidad” o “edema de baja presión”.

Esta entidad clínica ha recibido múltiples definiciones hasta la Conferencia Americano-Europea de Consenso en 1994 y en 1998 que estableció unos criterios diagnósticos concretos [4, 5]. Consideraba el SDRA y el DPA dos entidades que comparten los criterios diagnósticos de: hipoxemia de instauración brusca, presencia de infiltrados radiológicos difusos y ausencia de etiología cardiogénica (presión capilar pulmonar < de 18 mm/Hg). Para distinguir ambas entidades utilizamos un criterio gasométrico, así pues cuando la relación PaO₂/FiO₂ es menor o igual de 200 hablamos de SDRA y cuando esta se encuentra entre 200 y 300 hablamos de DPA. Esta definición tiene las ventajas de la facilidad en su aplicación clínica y en la posibilidad de valorar la gravedad de la lesión. Sin embargo, tenía algunas limitaciones como son la variabilidad en la interpretación de los criterios radiológicos, y el hecho de que no establece con que FiO₂ y PEEP se realiza la valoración, lo que por la tanto puede hacer cambiar el criterio.

Posteriormente en 2011, y durante el Congreso de Sociedad Europea de Medicina Intensiva celebrado en Berlín, se presentó una nueva definición del SDRA que mejora la especificidad de la establecida anteriormente [6]. En este caso, se ha eliminado el concepto de “daño pulmonar agudo”, y sustituye esta entidad clínica por la denominación de “SDRA leve”. En parte, los autores justifican este cambio en la denominación por la infravaloración de la gravedad del DPA que se ha realizado por parte de algunos profesionales. Sin embargo, actualmente a nivel práctico se sigue utilizando la denominación de daño pulmonar agudo (DPA o ALI), que se encuentra muy extendida y aceptada [7]. Estos criterios diagnósticos también han sido aceptados para la lesión pulmonar post-toracotomía, ya que clínica e histopatológicamente son entidades superponibles [8].

Su incidencia en la población general se sitúa entre 20 y 50 pacientes por cada 100.000 habitantes y año según las series [9]. Su presencia es mucho más importante si nos fijamos en los pacientes de las unidades de cuidados intensivos, donde según los últimos estudios multicéntricos, aparece hasta en un 19% de los pacientes sometidos a ventilación mecánica [10]. A pesar de los avances en su tratamiento, en base a la mayor evidencia científica actual, estas formas de daño pulmonar se siguen asociando a una mortalidad muy significativa (34-58% en el caso del SDRA) [3]. En este caso nos vamos a referir a su aparición tras la CRP donde constituye una complicación, que si bien no excesivamente frecuente, tiene gran relevancia en la morbimortalidad de los pacientes quirúrgicos y condiciona en gran medida el pronóstico a corto y largo plazo.

Actualmente los procedimientos de CRP se siguen considerando intervenciones quirúrgicas de riesgo moderado o alto. A pesar de una comorbilidad cada vez mayor en los pacientes, la mortalidad no ha cambiado en los últimos años. Sin embargo, se observa un cambio en las complicaciones, que han pasado de ser principalmente cardiológicas y quirúrgicas a convertirse en infecciosas y respiratorias [11]. Este cambio ha condicionado un renovado interés por el daño pulmonar tras la CRP. Con unos 190.000 casos por año en los Estados Unidos, que condicionan unos 3,6 millones de días de hospitalización, la lesión pulmonar continúa siendo una fuente importante de morbilidad y mortalidad tras la CRP [12].

En estos momentos se considera que la incidencia global de DPA tras CRP sitúa en torno al 3-4% [13-16]. Si bien es menos frecuente en lobectomías (2-4%), se hace mucho más presente y de peor pronóstico en neumonectomías (6-8%) o resecciones ampliadas (10,5%). En contraste con otras complicaciones postoperatorias, la incidencia de DPA tras CRP no se ha visto reducida en las últimas dos décadas.

La mortalidad postoperatoria tras la CRP se sitúa en el 1,5-4% de los pacientes [17], con unas cifras en torno al 2% para las lobectomías y un 6% para las neumonectomías [8]. Si bien los pacientes con criterios de SDRA moderado y grave son más escasos (1-3%), su mortalidad se encuentra muy elevada y se sitúa en torno al 70%, en cambio para los pacientes con DPA (o SDRA leve) es de un 30% [14]. El daño pulmonar agudo postoperatorio condiciona el pronóstico vital, así en algunas series es la principal causa de fallecimiento de los pacientes sometidos a CRP, explicando el 35-72% de la mortalidad global. La mortalidad en los pacientes que presentan DPA o SDRA tras CRP está descendiendo en los últimos años. Así pues, en un estudio llevado a cabo en un hospital londinense se observó como en los últimos 10 años la incidencia de SDRA moderado-grave se redujo de un 3,2 a un 1,6 % ($p=0,01$) y la mortalidad de un 72% a un 45% ($p=0,05$) [18]. Los autores consideran que esta disminución en la morbimortalidad, se debe a la menor agresividad quirúrgica y a la optimización en las estrategias de ventilación pulmonar protectora en los periodos intra y postoperatorios. Igualmente, es probable que el uso generalizado del fibrobroncoscopio durante el intraoperatorio, para optimizar la colocación del tubo de doble luz y la aspiración de secreciones, así como el mayor conocimiento respecto a las causas desencadenantes del daño pulmonar hayan contribuido a reducir la morbimortalidad de estos pacientes.

Licker en 2003 [16] distinguió, en un estudio sobre 879 pacientes postquirúrgicos, dos subtipos de DPA en los 37 (4.2%) pacientes afectados por esta lesión según su evento desencadenante. Así pues habló de *DPA secundario* en los 10 pacientes que asociaron un evento intercurrente asociado (neumonía, broncoaspiración, fistula broncopleurales o tromboembolismo) y presentaron sintomatología después del tercer día postoperatorio. En contraposición, consideró como *DPA primario* a los otros 27

pacientes que no presentaron otro evento clínico, siendo su presentación entre el primer y el tercer día postoperatorio, asociándose esta forma de DPA a una menor mortalidad (26% vs 60%). Esta distinción entre estos dos subtipos de presentación clínica, con una etiología así mismo diferenciada, se mantiene en la actualidad. Así mismo, describió los principales factores de riesgo asociados para el desarrollo de DPA primario después de un análisis por regresión logística de distintos ítems: el alcoholismo crónico, la neumonectomía o resección pulmonar ampliada, el mantenimiento de elevadas presiones de ventilación durante la ventilación unipulmonar (OLV), y la cantidad de fluidos administrados, se han considerado factores con una implicación importante en su desarrollo.

Como vemos, las complicaciones pulmonares postoperatorias constituyen a día de hoy la principal causa de mortalidad precoz tras CRP. Una de estas posibles complicaciones es el DPA/SDRA, siendo una de las que asocia una mortalidad más elevada debido a la extensión y gravedad de la lesión pulmonar y a la lesión multiorgánica asociada. Más allá de la importante mortalidad asociada, hay que recordar que algunos supervivientes persisten con una disfunción pulmonar que condiciona su tolerancia al ejercicio y su calidad de vida después de 2 años [12].

1.2 FISIOPATOLOGÍA:

La patogenia del daño pulmonar tras la cirugía torácica, implica la interacción de distintos factores etiológicos en una secuencia de múltiples agresiones intercurrentes que aparecen en el contexto del trauma quirúrgico y la ventilación mecánica. Así pues, tiene lugar una respuesta inflamatoria aguda secundaria que lesiona el epitelio y endotelio alveolar, lo que condiciona una alteración de la permeabilidad de dicha barrera endotelial, con paso de proteínas de elevado peso molecular y acumulación de edema en los espacios alveolares[19].

La ventilación mecánica per sé, como veremos en detalle a continuación, produce daño pulmonar agudo. Sin embargo, esta lesión aparece con mayor frecuencia y gravedad en los procedimientos de cirugía de resección pulmonar [20]. La especial susceptibilidad de los procedimientos de CRP a condicionar DPA postoperatorio parece que pudiera obedecer a tres motivos principales implicados en la génesis de una respuesta inflamatoria aguda:

En primer término, **la ventilación unipulmonar** sobre el pulmón dependiente. La OLV implica en sí misma una agresión para el pulmón dependiente mayor que la ventilación bipulmonar debido a que el volumen corriente que habitualmente usamos en los pacientes (en torno a 6 ml/Kg) repartido en la capacidad de ambos pulmones, ahora se administra sobre un único pulmón, condicionando mayor posibilidad de lesión alveolar por presión o volumen. Así mismo, la posición declive de este pulmón condiciona: mayor perfusión por efecto gravitatorio (efecto añadido a la VPH), compresión de las porciones basales por la presión de las vísceras abdominales sobre un diafragma sin tono por el efecto de los relajantes neuromusculares, y compresión de las porciones externas por el efecto del rodillo utilizado para la colocación de los pacientes para la realización de una toracotomía posterolateral.

En segundo lugar, el **colapso pulmonar** del pulmón no dependiente. Este colapso pulmonar es imprescindible para la realización del procedimiento quirúrgico. Implica el desarrollo de atelectasias alveolares, isquemia del tejido pulmonar y la posterior reperusión que resulta así mismo deletérea.

Por último, la **manipulación quirúrgica** podría tener una influencia sobre el grado de daño pulmonar agudo. La manipulación quirúrgica de un órgano delicado, como es el pulmón, puede provocar una lesión parenquimatosa similar a una contusión pulmonar, que puede favorecer una respuesta inflamatoria. La influencia aislada de la manipulación quirúrgica del parénquima pulmonar sobre el DPA postoperatorio no ha sido determinada previamente. Sin embargo, la aparición más frecuente de DPA en los procedimientos quirúrgicos del lado derecho se ha relacionado con la linfadenectomía de ese lado, que provoca una alteración del drenaje linfático de ambos pulmones[14].

La alteración de la permeabilidad a nivel endotelial se considera como el factor común y desencadenante de las lesiones en el DPA. Hace casi dos décadas se comprobó experimentalmente, mediante la detección de albúmina marcada con Tecnecio-99 con escintigrafía, como en el postoperatorio inmediato existía una alteración de la permeabilidad en el pulmón contralateral [21].

Ya Zeldin en 1984 había descrito como tras la CRP había un aumento en el lecho vascular pulmonar remanente, esto es debido a la pérdida del lecho del tejido pulmonar resecaado produciéndose un reclutamiento vascular en el resto del parénquima pulmonar [2]. Este hecho, exacerbado por la alteración de la permeabilidad endotelial, y una eventual sobrecarga hídrica con balance de fluidos positivo, favorecía el desarrollo de edema alveolo-intersticial debido al aumento de la presión hidrostática capilar. El aumento de la presión hidrostática en los vasos pulmonares es frecuente en el postoperatorio, debido a que en muchos casos ya existe un cierto grado de hipertensión

pulmonar previa debido al padecimiento de neumopatías crónicas (EPOC...), a esto se suma la mencionada reducción del lecho vascular remanente, la alteración quirúrgica del drenaje linfático, así como otros estímulos que provocan hipertensión pulmonar como son la hipoxemia y la hipercapnia, no infrecuentes en el postoperatorio de estos pacientes. [22]

1.2.a) VENTILACIÓN MECÁNICA:

La ventilación es una de las funciones vitales que puede sustituirse por medios artificiales. Sin embargo, se ha observado que, a pesar del control que tenemos sobre los parámetros de la ventilación artificial (presión, volumen, FiO₂...), existe un daño pulmonar asociado que se conoce desde los años sesenta y setenta y que posteriormente se ha llamado VILI (por sus siglas en inglés: *ventilator induced lung injury*) [23, 24]. Hace décadas que se conoce que la ventilación mecánica puede provocar edema pulmonar no cardiogénico y lesiones tisulares en pulmones sanos.

Clásicamente se han considerado como factores mecánicos etiológicos de la VILI: el atelectrauma, por ciclos repetidos de colapso y apertura de unidades alveolares; el barotrauma, al ejercer una presión excesiva en las unidades alveolares; y el volutrauma, término acuñado por Dreyfuss en los 80 que defiende que no es la presión sino la distensión de las unidades alveolares la principal responsable de la lesión tisular. Además de estos factores mecánicos con cizallamiento y sobredistensión alveolar, la presión positiva intratorácica no fisiológica que se produce durante la ventilación mecánica aumenta la permeabilidad capilar pulmonar, reduce la perfusión tisular y disminuye el gasto cardíaco.

Ante la existencia de VILI se desarrollaron estrategias de *ventilación pulmonar protectora*, consistentes en la utilización de bajos volúmenes corrientes (6-8 ml/Kg) y limitación de la presión que estos generaban sobre la vía aérea, frente a los volúmenes clásicamente empleados de hasta 10-12 ml/Kg. Así mismo, se observó como la estrategia de utilizar presión positiva al final de la espiración (PEEP) y maniobras de reclutamiento, disminuía la aparición de atelectasias al final de la espiración, manteniendo más alveolos abiertos. Frente a estas estrategias, la ventilación pulmonar no protectora aumenta la incidencia y magnitud de estas lesiones que son casi indistinguibles de las que se observan en el SDRA [24].

Las células del epitelio y endotelio de los alveolos están sometidas de manera constante a ciclos de estiramiento y retracción durante la ventilación espontánea. Con la ventilación mecánica a presión positiva, estos ciclos de deformación, con o sin llegar a la ruptura celular, van a desencadenar una respuesta celular y humoral. Esto va a provocar la interacción de distintos mediadores inflamatorios con las células del epitelio alveolar, endotelio capilar y macrófagos alveolares, provocando consecuentemente lesión pulmonar[25]. El inicio de la VILI ha sido vinculado a múltiples mecanismos incluyendo la apertura y colapso repetido de los alveolos, cambios en las presiones de perfusión, alteración en la estructura celular de parénquima pulmonar, la inflamación con reclutamiento de neutrófilos o la inactivación del surfactante. La característica común y definitoria de la VILI es la aparición de edema alveolar, debido a una alteración de barrera alveolo-capilar.

La activación del fenómeno inflamatorio se produce debido a un complejo mecanismo a nivel molecular, este traduce el estímulo físico causado por los ciclos repetidos de deformación celular, en una cascada de activación intracelular

desencadenada a través de proteínas de membrana y canales mecano-sensibles [26, 27]. Ante fuerzas de estiramiento las células responden mediante la modificación de su membrana plasmática y citoesqueleto, su patrón de crecimiento y la expresión de receptores en la membrana, propagan señales mediante canales intercelulares y secretan distintas moléculas [28].

Así pues la deformación celular produce un cambio conformacional en dichas proteínas (integrinas, canales iónicos) que actúan como mecanorreceptores. A su vez esto activa a la protein quinasa A y fosfatidil-inositol que interaccionan con cascadas de señalización intracelular, como la vía de las MAPK (mitogen-activated protein kinase), que transmiten la señal hasta el interior de la célula[29-31]. Finalmente, se produce una modificación de la expresión genética, el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$) es capaz de activar el proceso de transcripción de determinadas citoquinas proinflamatorias, así como activar los procesos de apoptosis [32-34].

En los últimos años, después de observar como las estrategias de ventilación pulmonar protectora se asociaban a menores niveles de mediadores proinflamatorios, ha surgido el concepto del biotrauma. Por lo tanto podemos hablar de un fenómeno lesional debido a la liberación de citoquinas y otros mediadores por parte del pulmón durante la ventilación mecánica, con desarrollo de inflamación y activación de sistema inmunológico[35]. Esta liberación se produce a pesar de que no se produzca lesión mecánica tisular, simplemente por la interacción de fuerzas no fisiológicas y la concurrencia de los factores mecánicos mencionados anteriormente. Así mismo la diseminación orgánica de estos compuestos puede producir potencialmente disfunción de otros órganos, como hígado o riñón, y desencadenar un fallo multiorgánico[36]. Las

células epiteliales del pulmón son como vemos participantes activas de la VILI y no sólo el sustrato de la lesión.

La liberación de mediadores inflamatorios en la VILI que desencadenan el biotrauma se produce, por lo tanto, por mecanismos distintos. Por un lado, la mecanotransducción va a producir una activación inflamatoria. Así mismo, la muerte celular por necrosis tras la rotura de la membrana plasmática también va a desencadenar inflamación, fenómeno que va asociado invariablemente a la necrosis celular. Como vemos la descripción del biotrauma no excluye que los conceptos clásicos de barotrauma, volutrauma y atelectrauma sigan teniendo vigencia como causantes del VILI [37].

1.2.b) VENTILACIÓN UNIPULMONAR:

La ventilación unipulmonar es una técnica ampliamente utilizada para facilitar el acceso quirúrgico durante las intervenciones torácicas que permite aislar un pulmón de la ventilación mecánica. Esto condiciona un colapso de ese pulmón, lo que permite manipular con mayor libertad en ese hemitórax durante el procedimiento quirúrgico. En el tejido pulmonar, en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno se produce una vasoconstricción arterial reactiva que desvía el flujo sanguíneo hacia las unidades alveolares con mayor presión de O₂, este fenómeno se denomina vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH). Este es un mecanismo reactivo que depende directamente de la contracción refleja de la célula muscular lisa vascular en respuesta a la hipoxia, después de la despolarización ligada a canales de potasio y calcio [38]. Este reflejo

adaptativo deriva la sangre arterial de las unidades peor ventiladas, a aquellas que tienen una ventilación más adecuada.

El volumen corriente fisiológico se sitúa en torno a 6-7 ml/Kg, que se reparten entre ambos pulmones en la ventilación bipulmonar. Durante los procedimientos que precisan ventilación unipulmonar, este volumen corriente se administra a un único pulmón lo que condiciona una mayor presión de ventilación, frecuencia respiratoria y una mayor FiO₂ que permita compensar la pérdida de una importante proporción de tejido pulmonar.

Por lo tanto, la OLV va a condicionar distintos estímulos implicados en el DPA como barotrauma, volutrauma, atelectrauma o hiperoxia que actúan sobre el pulmón ventilado o dependiente. En el pulmón sometido al procedimiento quirúrgico (no dependiente) tiene lugar una hipoperfusión relativa como consecuencia de la VPH y un *síndrome de isquemia-reperfusión* (SIR) posterior en el tejido pulmonar remanente, tras la re-expansión de ese tejido a la finalización del procedimiento. Estos estímulos dañan la membrana alveolocapilar, favoreciendo el edema alveolar y la microtrombosis en los capilares alveolares [39, 40] y desencadenan una respuesta inflamatoria aguda con liberación de interleuquina-8 (IL-8), interleuquina-1 (IL-1) o factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) [41, 42].

Ante la sospecha de que la OLV puede producir por sí misma daño pulmonar, se han desarrollado estrategias de ventilación de protección pulmonar que incluyen el empleo de bajos volúmenes corrientes (< 6 ml/Kg), bajas presiones de meseta inspiratorias (< 25 cmH₂O), utilización de PEEP y maniobras de reclutamiento. En dos estudios sobre humanos, se observa disminución de las concentraciones de TNF- α y de las moléculas de adhesión intercelular soluble (iCAMs) en el lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes ventilados con bajos volúmenes corrientes frente a los ventilados con altos volúmenes corrientes [43], y una atenuación de la respuesta proinflamatoria

sistémica en pacientes ventilados con VC 5 ml/Kg y PEEP 5 cmH₂O frente a los ventilados con VC 10 ml/Kg y sin PEEP, en pacientes sometidos a esofagectomía[44]. También en la CRP, la ventilación protectora ha demostrado disminuir la incidencia de DPA y otras complicaciones postoperatorias como la presencia de atelectasias [45]. No obstante, a pesar de las estrategias de ventilación de protección pulmonar, las complicaciones pulmonares postoperatorias siguen siendo un problema clínico de tremenda repercusión (debido a su elevada mortalidad) tras la OLV, lo que obliga a plantear estrategias nuevas y complementarias que permitan disminuir la severidad de este daño pulmonar postoperatorio.

La participación de los procesos inflamatorios durante la OLV y el papel de las citoquinas también parece fundamental. Así pues, se ha observado que durante las cirugías con OLV existe un proceso inflamatorio, que afecta fundamentalmente al pulmón dependiente, con reclutamiento de neutrófilos y la secreción de moléculas proinflamatorias como IL-8, IL-1alfa, TNF-alfa, especies reactivas de oxígeno, eicosanoides o complemento. En el inicio de este proceso inflamatorio los macrófagos alveolares parecen tener un papel fundamental [46]. En general, se han observado respuestas inflamatorias de carácter agudo en todos los contextos quirúrgicos que implican OLV, cuantitativamente superiores a las observadas en otras cirugías que conllevan ventilación bipulmonar [20, 47].

Las altas concentraciones de oxígeno utilizadas durante la cirugía en el lado contralateral para compensar el efecto shunt del pulmón intervenido, favorecen un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) así como una alteración de los sistemas antioxidantes con alteración del balance redox [48]. Este componente de estrés oxidativo tiene una importancia muy relevante

durante la re-expansión pulmonar con la que finaliza la OLV, en este momento tiene lugar un proceso de reperfusión y re-oxigenación del pulmón no dependiente, que se ha visto relacionado con un aumento súbito en los niveles de anión superóxido [49] y otras especies reactivas de oxígeno [50], con una reducción asociada en los sistemas antioxidantes producida durante la isquemia (superóxido dismutasa).

El daño pulmonar agudo tras las toracotomías con OLV también se ha observado repetidamente tras otras cirugías distintas de la resección pulmonar como son las esofaguectomías. De hecho la incidencia de DPA/SDRA tras la esofaguectomía tiene una incidencia muy superior a la que se produce tras la CRP, situándose entre un 10 y un 30% según las series[51] [52]. Así mismo se ha descrito un mecanismo inflamatorio agudo presente desde el periodo intraoperatorio, detectándose una liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-8, VEGF, TNF-alfa)[53], un aumento de los neutrófilos en el LBA, mayor activación neutrofílica según los niveles de elastasa y CD11-b (receptor de superficie para las integrinas). Si bien el mecanismo preciso del daño pulmonar agudo tras la esofaguectomía no está bien descrito, si se ha encontrado un relación directa entre esta reacción inflamatoria aguda y el desarrollo posterior de daño pulmonar. La OLV parece el mecanismo común más lógico para el daño pulmonar tras la esofaguectomía y la CRP, los periodos más prolongados de colapso pulmonar y OLV que tienen lugar durante la primera para poder tener un acceso óptimo al esófago explicarían la mayor incidencia de DPA que existe tras estos procedimientos [41].

1.2.c) SÍNDROME ISQUEMIA-REPERFUSIÓN:

Si bien el pulmón ventilado durante la OLV está sometido a un importante grado de estrés oxidativo, debido a las mayores concentraciones de oxígeno utilizadas, el pulmón colapsado o no dependiente se va a afectar por un fenómeno de isquemia-reperfusión.

Este fenómeno que ocurre como consecuencia de la OLV, debido al colapso del pulmón no dependiente y la posterior perfusión del tejido pulmonar remanente con la re-expansión, tiene una importancia capital en el desarrollo de DPA postoperatorio. Durante la isquemia se produce un metabolismo anaerobio en esos tejidos con acúmulo de ácido láctico, acidosis y una cinética enzimática alterada. Esto provoca depleción de ATP con lesión celular, edema intersticial, y finalmente muerte celular por la incapacidad para mantener la integridad de las membranas celulares [46, 50]. La perfusión, aunque necesaria para restaurar el suministro de energía y la viabilidad celular, paradójicamente puede ser lesiva favoreciendo la lesión tisular local, y liberando mediadores inflamatorios y sustancias tóxicas a la circulación general. Este efecto paradójico parece estar mediado por sustancias pro inflamatorias liberados por el endotelio, especies reactivas de oxígeno y neutrófilos.

Así mismo, se ha observado como el síndrome isquemia-reperfusión induce un daño pulmonar agudo también en el pulmón dependiente contralateral que no ha estado sometido a isquemia, así como una lesión orgánica sistémica por la liberación de mediadores [54]. En algunos estudios incluso se observa mediante tomografías torácicas como el daño pulmonar se produce de manera asimétrica, afectando más al pulmón contralateral a la cirugía, reflejando que quizá la liberación de mediadores por parte del pulmón no dependiente afecte de manera preferente al pulmón dependiente, lo cual se suma a otros insultos como la hiperoxia y las fuerzas mecánicas que afectan selectivamente a este pulmón durante la OLV[55]. Así mismo, desde el inicio de la

OLV existe un componente de hiperperfusión en el pulmón dependiente que aumenta las fuerzas de cizallamiento sobre las células del endotelio capilar, este hecho junto con las fuerzas mecánicas condicionadas por la ventilación mecánica con altas presiones puede dar inicio al daño alveolar difuso que va a desarrollarse posteriormente [56].

1.2.d) MANIPULACIÓN QUIRÚRGICA:

Aunque probablemente la OLV puede condicionar por sí misma un factor importante para el desarrollo de DPA, la manipulación quirúrgica necesaria para llevar a cabo la disección del tejido pulmonar sería otro factor a tener en cuenta de forma diferenciada, ya que puede lesionar el pulmón de forma similar a una contusión pulmonar. Según nuestro conocimiento, no existen estudios que hayan determinado de manera precisa la influencia aislada del procedimiento quirúrgico en el DPA tras la CRP con OLV.

Previamente, sí se ha observado como la respuesta inflamatoria sistémica asociada a distintos procedimientos quirúrgicos se encuentra relacionada con el grado del trauma quirúrgico (definido por la duración y la pérdida de sangre intraoperatoria) [20]. En estudios sobre esofagectomías se ha observado como la experiencia del equipo quirúrgico y duración del procedimiento (además de la duración de la OLV) se asocian al desarrollo de DPA en el postoperatorio [51]. Así mismo, el aumento de la permeabilidad endotelial medido con radioisótopos tras la esofagectomía, afecta de manera preferente al hemitórax sometido a cirugía [57], revelando un posible papel de la manipulación quirúrgica en la lesión pulmonar. Paradójicamente, en un estudio sobre pacientes sometidos a CRP, se ha observado como tras las neumonectomías los niveles de citoquinas circulantes en el postoperatorio eran menores respecto a las resecciones en

cuña y las lobectomías (a pesar de un mayor tiempo quirúrgico y de OLV) [58]. Estas observaciones refuerzan el papel de la manipulación quirúrgica, y del tejido pulmonar remanente, sobre la respuesta inflamatoria en la CRP.

Especialmente ilustrativa resulta la observación de la respuesta inflamatoria tras las esofagectomías y las CRP realizadas por videotoracoscopia (VATS) respecto a los procedimientos por toracotomía abierta, donde el grado de trauma quirúrgico resulta evidentemente mayor. A pesar de que la realización de VATS condiciona por lo general un mayor tiempo quirúrgico (y mayor tiempo de OLV), las respuestas inflamatorias observadas son menores en la VATS respecto a la cirugía abierta, tanto en el caso de la cirugía esofágica [59] como de la CRP [60-62]. Por lo tanto, el papel del trauma quirúrgico sobre la respuesta inflamatoria secundaria tras la CRP parece resultar más que relevante.

Como vemos, el daño pulmonar agudo tras la CRP parece la manifestación pulmonar de una lesión panendotelial como consecuencia de un proceso inflamatorio, desencadenado fundamentalmente por el procedimiento quirúrgico y la OLV. Son múltiples los factores etiológicos que se han asociado a esta entidad patológica: la sobrecarga hídrica, la alteración del drenaje linfático, el aumento en la presión hidrostática capilar, la lesión asociada a la ventilación mecánica, el síndrome isquemia-reperfusión, la toxicidad por oxígeno o el fracaso ventricular derecho [17]. Estos distintos estímulos generan distintos mecanismos fisiopatológicos implicados en la lesión pulmonar durante la OLV.

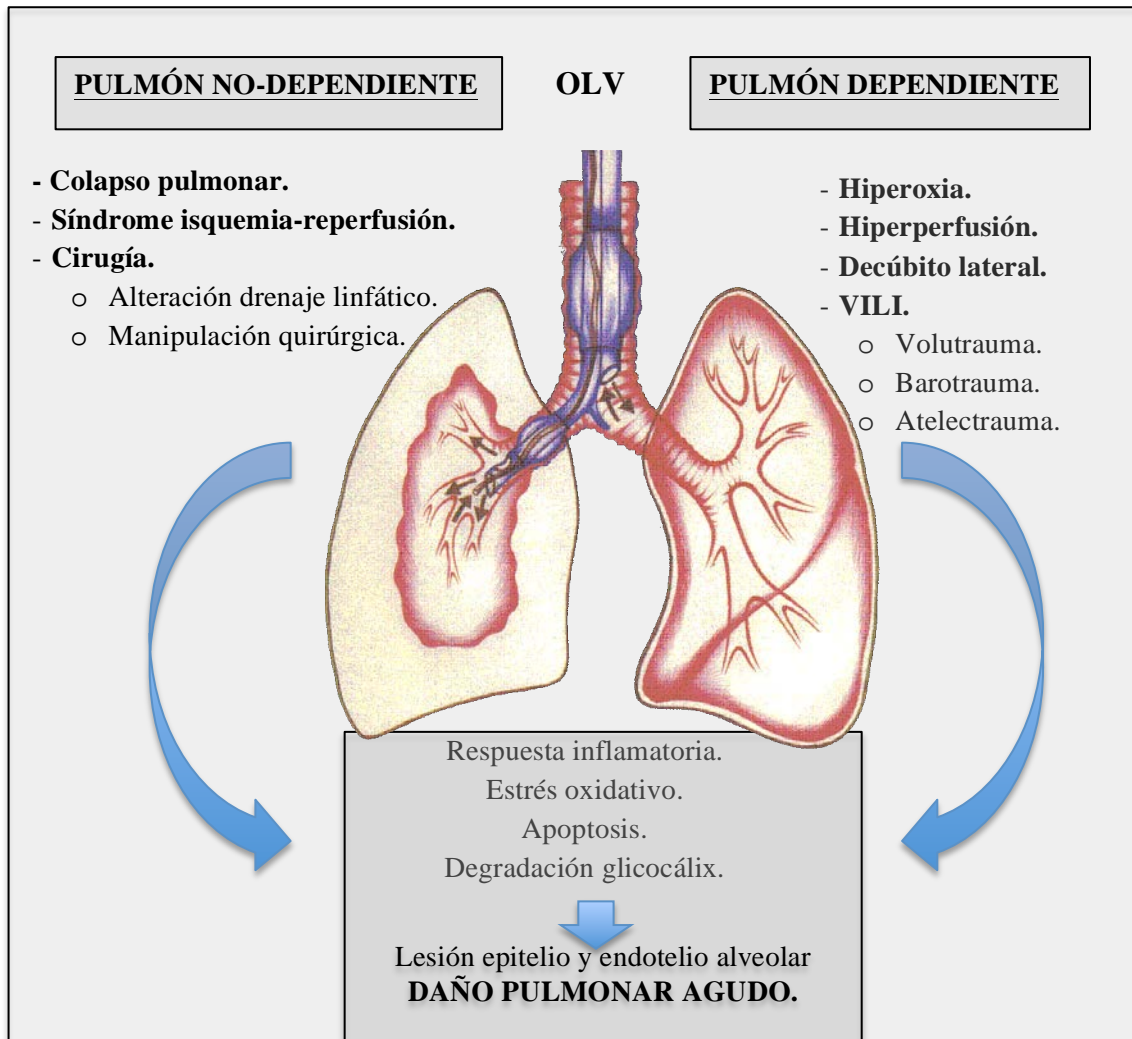


Figura 1 Factores implicados en el daño pulmonar agudo tras CRP con OLV.

2) MARCADORES BIOLÓGICOS DE LA RESPUESTA

INFLAMATORIA PULMONAR:

2.1) RESPUESTA INFLAMATORIA.

En el estudio de la patogénesis del DPA postoperatorio se ha revelado un complejo proceso proinflamatorio, en el que existe una interacción entre células inflamatorias circulantes, los mediadores inflamatorios y las células endoteliales y epiteliales de la membrana alveolocapilar. Provocando en último término una alteración en el normal funcionamiento de esta estructura funcional, dando inicio al proceso del daño pulmonar agudo [41].

La respuesta inflamatoria ligada al DPA implica a una serie de células y mediadores que regulan ese proceso. Al comparar el ratio entre citoquinas en suero y en LBA, se ha observado cómo muchos de los mediadores implicados tienen un origen pulmonar primario [63].

El balance entre los mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios va a regular el proceso. Su origen puede ser bien una secreción activa por parte de células que han sido reclutadas al espacio alveolar, o por el contrario se pueden liberar tras la activación celular local.

Probablemente el evento inicial que desencadena la respuesta inflamatoria en el DPA postoperatorio sea el daño endotelial y epitelial. Su activación induce un estado protrombótico y proinflamatorio, con un aumento de la liberación de distintos mediadores.

- NEUTRÓFILOS

Los hallazgos de las muestras histológicas y del LBA han demostrado como los neutrófilos son fundamentales en el DPA. En una fase inicial se produce la “captura y rodamiento” de los neutrófilos mediada por la acción de selectinas del endotelio activado. En segundo lugar, cuando los neutrófilos han sido activados por distintos mediadores, se produce la “adhesión” de estos neutrófilos por la interacción de las integrinas de su membrana con la ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular) endotelial. Finalmente, hay una “migración transendotelial” de los neutrófilos en respuesta a estímulos quimiotácticos hasta el alveolo, donde liberan distintos mediadores implicados en el daño celular y la amplificación de la respuesta inflamatoria.

De hecho, los neutrófilos constituyen las principales células efectoras de la respuesta inflamatoria celular, constituyendo el 70-80% de las células en el LBA de los pacientes con DPA, respecto al 1-3% de los individuos sanos [64]. Así pues se observa un aumento de estos en relación a su reclutamiento pulmonar desde el torrente sanguíneo y activación como consecuencia de la acción de la IL-8, entre otras moléculas quimioatrayentes secretadas por los macrófagos alveolares en situación de hipoxia y lesión pulmonar[65-67]. Así mismo, se favorece su permanencia en el tejido pulmonar a través de una disminución de su apoptosis [68]. Incluso en las primeras 24 horas después de esofaguectomías con OLV se ha encontrado un aumento en el número de neutrófilos pulmonares en el LBA[69].

El proceso de migración de los neutrófilos a los pulmones requiere así mismo de interacciones con proteínas de membrana a nivel de la célula endotelial, como son las

integrinas [70]. A su vez estas células producen con su degranulación sustancias lesivas para los tejidos circundantes como las ROS, elastasa, colagenasa y mieloperoxidasa, lo que provoca lesión celular directa en relación a los fenómenos de estrés oxidativo[71].

El papel de los neutrófilos en el DPA resulta fundamental y se ha determinado no sólo su abundante recuento total [72-74], sino que su persistencia después de realizar LBA seriados se asocia a un aumento de la mortalidad[75]. Además parece que al bloquear su migración se puede atenuar la gravedad del cuadro [76, 77].

- CITOQUINAS

Son péptidos de bajo peso molecular que son sintetizados y liberados por multitud de células entre las que se incluyen los neutrófilos, el sistema monocito/macrófago, los linfocitos, o las células del epitelio y endotelio alveolar. Se unen a receptores específicos de membrana y activan cascadas de transducción intracelular. Alteran la expresión de determinados genes, lo que finalmente produce una respuesta biológica concreta. La producción de citoquinas suele ser transitoria y limitada al lapso de tiempo que dura el estímulo.

Las citoquinas se consideran mediadores inflamatorios que están implicados en diferentes estados patológicos del pulmón [78]. Dentro del concepto de citoquinas se agrupan sustancias como interleuquinas, interferones, quimioquinas, factores estimulantes de colonias o factores de crecimiento. Estos compuestos modifican la actividad celular y tienen un papel central en el control del proceso inflamatorio así como la reparación tisular, la fibrosis y la angiogénesis[79]. Sus acciones se realizan a

muy cortas distancia, a diferencia de otros compuestos proteicos como las hormonas. Cabe recordar que cada citoquina puede sintetizarse por más de un tipo de célula y actuar sobre tipos celulares diferentes y cada célula expresar receptores para más de un tipo de citoquina. Además citoquinas diferentes, pueden tener la misma acción biológica, lo que explica la complejidad de la caracterización del proceso regulatorio.

Muchos estudios han demostrado la liberación de citoquinas proinflamatorias en el DPA como IL-8, IL-1, TNF-alfa e IL-6 [41], cuya función es iniciar y amplificar la respuesta inflamatoria. La accesibilidad del pulmón para la obtención de muestras como el LBA ha permitido observar los cambios locales que se producen en los niveles de citoquinas y otros mediadores inflamatorios en el daño pulmonar agudo. De este modo, se ha observado un aumento precoz en la producción local de citoquinas en pacientes que posteriormente desarrollaban un DPA clínicamente relevante, aumento que sin embargo no se correlacionaba con una elevación de los niveles sistémicos [80]. Esto lleva a pensar que la obtención de muestras pulmonares, puede desvelar hallazgos precoces, capaces de predecir la evolución de los pacientes, antes de que estos cambios sean objetivables a nivel sistémico. Estos niveles elevados de citoquinas no se observan en otros tipos de edema pulmonar como el edema de origen cardiogénico [81].

Estos hallazgos también abren la posibilidad de evitar la progresión del cuadro clínico actuando a un nivel precoz del proceso, atenuando la liberación o actividad de estas moléculas. Sin embargo, a día de hoy, los biomarcadores de daño pulmonar agudo no dejan de ser una herramienta útil para la investigación del DPA, su falta de especificidad y sensibilidad aún los hacen poco adecuadas para guiar la práctica clínica.

A continuación nos centraremos en algunas citoquinas producidas a nivel pulmonar y particularmente implicadas en el DPA postoperatorio.

2.1.a) IL-1

Las interleuquinas son un conjunto de proteínas solubles de bajo peso molecular, sintetizadas fundamentalmente por los leucocitos, aunque también pueden originarse en el endotelio, la médula ósea o el timo. Existen distintos subtipos de interleuquinas que difieren tanto desde el punto de vista bioquímico, como biológico. Así, por ejemplo, las IL-4, IL-10, IL-11 presentan efectos anti-inflamatorios, mientras que las IL-1(α y β), IL-6 e IL-8 presentan efectos pro-inflamatorios y de activación del sistema inmune.

La IL-1, codificada en el cromosoma 2, fue históricamente una de las primeras interleuquinas descritas. Se sintetiza fundamentalmente por los macrófagos alveolares activados en respuesta al TNF- α . Es un mediador clave en la respuesta inflamatoria actuando como pirógeno, provocando neutrofilia, quimiotáxis de granulocitos y un aumento en la síntesis de reactante de fase aguda y otros mediadores inflamatorios.

Existen tres formas de esta interleuquina: IL-1 α , intracelular o adherida a la membrana celular y con efectos paracrinos en el entorno de la célula secretora; IL-1 β secretada a la circulación y que interacciona con receptores de tipo 1 (en la mayoría de células del organismo) y o de tipo 2 (en las células del sistema inmune); IL-1RA, inhibitoria, actuando como antagonista de las dos anteriores.

La IL-1 se encuentra elevada a nivel sistémico y pulmonar en pacientes con SDRA, asociada a una respuesta inflamatoria aumentada [82-84]. También esta implicada en el desarrollo de la lesión por isquemia-reperfusión pulmonar y en la generación de radicales libres asociada a ésta [85, 86]. Parece estar implicada en la oclusión

trombótica de la microcirculación pulmonar y el aumento de la permeabilidad vascular en respuesta a determinadas agresiones al tejido pulmonar.

Su actividad en la lesión pulmonar inducida por endotoxina se encuentra elevada desde la primera hora, revelando un papel precoz en la respuesta inflamatoria pulmonar [87]. La inhibición selectiva de IL-1 β ha demostrado reducir la lesión pulmonar por isquemia-reperfusión en un modelo animal, observándose un menor número de neutrófilos en el LBA, así como un descenso en el RNA mensajero de citoquinas proinflamatorias [86].

2.1.b) **TNF-ALFA**

Es una citoquina proinflamatoria que estimula a su vez la producción de otras citoquinas e interviene en la activación de los neutrófilos. También puede actuar vía MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), fundamentalmente a través de la proteína JNK (quinasa c-Jun N-terminal), involucrada en la diferenciación y proliferación celular [88]. Así mismo, es capaz de inducir apoptosis activando la caspasa 8 por la vía extrínseca, aunque se trata de un mecanismo menor comparado con el sistema Fas/FasL (proteína Fas y FAS-ligando) [89].

Se encuentra elevada, así como los niveles de sus receptores, desde etapas iniciales en el DPA [90], y se considera que su producción principal tiene lugar a nivel de los macrófagos alveolares. Existen estudios que sugieren que los macrófagos alveolares producen menos IL-1 y más TNF- α que los monocitos plasmáticos [91], lo que explica que en los estudios en los que sólo se hacen determinaciones plasmáticas de

citoquinas a pacientes sometidos a ventilación mecánica convencional, el TNF- α no varíe y sí lo haga en aquellos estudios que incluyen determinaciones en LBA [63].

Las estrategias de ventilación pulmonar protectora disminuyen los niveles de TNF- α y sTNF- α R en el LBA de pacientes con SDRA en comparación con la ventilación convencional [92], esto refuerza la observación en modelos animales de VILI en los que las estrategias de ventilación más perjudiciales para el pulmón se correlacionaban con un aumento de TNF- α [93].

Se ha observado en algunos estudios cómo su concentración y la de sus receptores (TNFr-I y TNFr-II) se encuentra asociada a la mortalidad en pacientes con SDRA [94, 95]. Un modelo de VILI en conejos demostró mejoría en la oxigenación y la complianza, así como menor reclutamiento de neutrófilos en animales previamente tratados con anticuerpos anti-TNF- α intratraqueal [96]. En un trabajo previo de nuestro equipo hemos podido observar como el DPA asociado a la ventilación unipulmonar se asociaba a un aumento del TNF-alfa en el LBA[97].

2.1.c) ICAM-1

La ICAM-1 (CD-54) es una glicoproteína de membrana que forma parte de las células endoteliales y del epitelio alveolar así como del sistema inmune y que se une a integrinas. Las células endoteliales y epiteliales alveolares activadas por determinadas citoquinas (IL-1, TNF- α) [98] expresan moléculas como la ICAM-1, que interactúa las integrinas de los leucocitos y promueve su migración transepitelial y activación [99].

Esta molécula de adhesión expresada en el epitelio alveolar y en el endotelio vascular, juega un importante papel en el reclutamiento de neutrófilos en el pulmón, y

se libera fundamentalmente con la lesión celular alveolocapilar. Resulta por lo tanto un marcador útil de DPA y con importancia pronóstica.

Distintos estudios han demostrado un incremento en la expresión de s-ICAM1 (ICAM-1 soluble) en el contexto de DPA[100, 101]. Así mismo, altos niveles se asocian a un peor pronóstico clínico de los pacientes[102]. En contraposición, en los pacientes con edema pulmonar de origen cardiogénico los niveles séricos y pulmonares de s-ICAM1 (molécula de adhesión intercelular-1 soluble) se encuentran disminuidos respecto a aquellos con DPA [103]. Al bloquear la expresión a nivel pulmonar de ICAM-1 se ha observado una atenuación del daño pulmonar asociado a los cuadros de pancreatitis aguda grave [104].

2.2) GLICOCALIX ENDOTELIAL: Syndecan-1

La proteína Syndecan-1 o CD-138 (codificada por el gen SDC-1) es un proteoglucano de tipo heparán sulfato que forma parte integral del glicocáliz de la membrana celular. A nivel general, la familia de proteoglucanos “*Syndecan*” intervienen en fenómenos de señalización celular, unión celular y organización del citoesqueleto. Syndecan-1 participa en los procesos de proliferación y migración celular así como en la interacción de la célula con la matriz extracelular mediante receptores específicos para Syndecan-1. El Syndecan-1 forma parte fundamental del glicocáliz, esta estructura se encuentra en la superficie de las células endoteliales y tiene un papel fundamental en la regulación de la permeabilidad del mismo, regulando la hidrodinámica endotelial y la migración celular a su través, como la extravasación de neutrófilos durante los procesos inflamatorios [105]. Parece que tiene un papel fundamental en la modulación de las interacciones leucocito-endotelio y en la

extravasación de los primeros [106], así como en la actividad de las citoquinas y los distintos factores de crecimiento. Estas interacciones otorgan al glicocálix un papel clave en la regulación de la respuesta inflamatoria [107], así mismo su integridad parece esencial para un correcto equilibrio de la permeabilidad alveolocapilar.

En el pulmón adulto, Syndecan-1 se expresa de forma significativa a nivel de las células epiteliales de las vías aéreas de mediano y mayor tamaño, así como en los neumocitos de tipo II. La expresión de syndecan-1 a nivel epitelial, endotelial, leucocitario o en macrófagos se encuentra finamente regulada en función de la acción de distintos factores de crecimiento [108]. Así mismo, estas proteínas Syndecan pueden presentarse como proteoglucanos solubles, debido a su fragmentación proteolítica a nivel de la región adyacente a la membrana y secreción al entorno extracelular [109]. Este fenómeno de la expresión de los dominios extracelulares de syndecan-1 ocurre como una parte de la respuesta regulada del organismo ante una agresión.

El papel de estas proteínas parece fundamental para el reclutamiento e infiltración alveolar de neutrófilos, propio de la fase aguda de la respuesta inflamatoria en el DPA. Así pues, la inactivación de la síntesis de estos proteoglucanos a nivel endotelial y leucocitario en modelos animales, ha demostrado afectar al rodamiento y unión de los neutrófilos al endotelio [110, 111], y la utilización de heparinasa en las células endoteliales inhibe la adhesión de los monocitos a las células del endotelio activado [112]. En una fase posterior, las proteínas Syndecan, modulan la migración transepitelial de los leucocitos al interior del alveolo a través de la generación de un gradiente de quimiocinas [107]. En experimentos con ratones knock-out para el gen SDC-1, se observa una acumulación perivascular de neutrófilos a nivel pulmonar debido a que su movimiento se interrumpe debido a la falta de un gradiente de

Syndecan-1 a nivel del borde epitelial [113]. Por otro lado, en estos ratones SDC-1^{-/-} fueron mas susceptibles al daño pulmonar agudo inducido por bleomicina, con una mayor mortalidad, que los wild-type. Paradójicamente, parece que syndecan-1 podría tener un papel en la localización del fenómenos inflamatorio, evitando su expansión descontrolada [114]. Los niveles séricos de Syndecan-1 se han utilizado como indicador de la degradación del glicocálix como reflejo del daño celular, por ejemplo en pacientes politraumatizados unos niveles séricos elevados se asociaron a una mayor activación de los procesos inflamatorios y a una mayor mortalidad asociada [115].

En conclusión parece que syndecan-1 tiene funciones pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el daño pulmonar agudo. La especificidad de este papel podría depender del patrón espacial y temporal de su expresión.

2.3) APOPTOSIS

La apoptosis, también denominada “muerte celular programada” es un fenómeno fisiológico esencial desde el punto de vista de la homeostasis. Está implicado en la remodelación y reparación tisular, en el desarrollo embrionario y fetal, así como en procesos patológicos como la atrofia de órganos tras obstrucción ductal, muerte neuronal, muerte celular secundaria a enfermedades virales, muerte celular tras estímulos que a mayores dosis causarían necrosis, y como mecanismo implicado en la muerte celular debida al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) entre otros.

Fue descrita en los años 70 al observarse muerte celular aislada en la corteza suprarrenal de ratas después de la exposición a un carcinógeno [116]. Se acompaña de la condensación del material nuclear y del contenido citoplasmático. Por lo tanto, los

productos intracelulares no son liberados al espacio extracelular, manteniéndose intactas la membrana plasmática y las organelas, y sin que exista respuesta inflamatoria asociada [117]. Estos hallazgos de condensación de la cromatina, encogimiento del citoplasma y la formación de fragmentos nucleares (cuerpos apoptóticos) pueden ser útiles como marcadores morfológicos[118]. Como contra punto, la necrosis, es otra forma de muerte celular en la cual se produce una alteración global de las estructuras de la célula, con pérdida de la integridad de las membranas y la liberación del contenido celular, lo que provoca una respuesta inflamatoria local asociada [119].

La apoptosis tiene un papel relevante en el DPA postoperatorio en la CRP debido a su capacidad para producir un daño epitelial directo, así como para influir en la respuesta inflamatoria invariablemente asociada [120].

2.2.a) Vías de activación de la apoptosis: CASPASAS.

Distinguimos, en términos generales, dos vías fundamentales de activación: *extrínseca e intrínseca*. En la primera, la apoptosis se desencadena por estímulos extracelulares (citoquinas, factores de crecimiento, óxido nítrico). En la segunda, sin embargo, el factor inicial es una alteración intracelular (calor, radiación, hipoxia, infecciones virales, calcio). Las señales pueden afectar positiva o negativamente a la apoptosis .

Muchas de las vías apoptóticas convergen en cascadas de activación de unas proteasas intracelulares, denominadas caspasas. Estas proteasas regulan los procesos de apoptosis mediante una compleja cascada de señalización intracelular, que lleva a la

disrupción del DNA y a la muerte celular, comportándose como moléculas reguladoras y efectoras.

Las caspasas son un grupo de proteínas intracelulares del grupo cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína en su centro activo y que se sintetizan como zimógenos, precursores enzimáticos inactivos. Se comportan como proteasas al fragmentar las proteínas a nivel de un residuo de aspartato (por lo que son también denominadas cisteinil-aspartato proteasas)

Las caspasas se pueden clasificar en dos tipos según su función, así pues hablamos de caspasas iniciadoras y caspasas efectoras[121]. Las caspasas iniciadoras serían sustrato de los numerosos estímulos que activan e inician la apoptosis y procesan las formas inactivas de las caspasas efectoras convirtiéndolas en sus formas activas, en lo que constituye un fenómeno de activación en cascada. Las caspasas efectoras son las verdaderas encargadas de la destrucción celular mediante un mecanismo muy similar a la cascada del complemento.

Existe un gran número de caspasas identificadas cuyas funciones van más allá de la apoptosis. Las caspasas 3, 8 y 9 son las más características de los fenómenos de muerte celular programada, sin embargo otras caspasas como 1 y 5 se han relacionado más con fenómenos inflamatorios. Se presentan como proenzimas de 30-50 kDa con tres dominios regulares: el dominio N-terminal implicado en la regulación de su activación, una subunidad mayor de 20kDa y otra menor de unos 10kDa. Se secretan como zimógenos inactivos (pro-caspasas) y aquellas relacionadas con la apoptosis pueden clasificarse como ya se ha comentado, en iniciadoras (2,8,9,10) y efectoras (3, 6, 7). La diferencia fundamental está en que las iniciadoras poseen grandes “pro-dominios” N-terminal que emplean para interacciones proteína-proteína[122]. Las

caspasas iniciadoras, son activadas por autoproteólisis en respuesta a algún factor desencadenantes e inician la apoptosis. Las caspasas efectoras son activadas por las anteriores y fragmentan otras proteínas que tienen como sustrato, lo que desencadena una serie de procesos intracelulares que culminan con la muerte celular. Son múltiples los sustratos posibles entre los que destacan el inhibidor de la DNasa activado por caspasas (iCAD), el poli ADPribosa polimerasa (PARP) y otras proteínas del citoesqueleto. Esto acaba provocando la detención del ciclo celular, la inhibición de su síntesis y reparación, fragmentación del DNA, disrupción de la membrana nuclear y condensación de la cromatina con colapso del citoesqueleto [123].

Las caspasas efectoras como caspasa 3, 6 y 7 son útiles en la detección de apoptosis, mientras que la detección de las iniciadoras como 8, 9 y 10 aportan más información acerca de la vía implicada. Igualmente hay que recordar que la apoptosis puede ocurrir con la presencia o no de actividad de las caspasas.

Por un lado en la vía extrínseca, la activación de receptores transmembrana de la familia TNF (como el FAS o el TNF- α RI) a través de FADD (Fas-associated protein with death domain) o TRADD (TNF receptor associated death domain)[124, 125] activan una cascada intracelular con participación de las caspasas iniciadoras (caspasa 8), que activa a su vez posteriormente a otras efectoras (caspasa 3), que hidrolizan proteínas celulares sobre residuos aspartato resultando en los cambios morfológicos característicos de la apoptosis como la fragmentación del DNA por endonucleasas y la muerte celular.

Por otro lado, en la vía intrínseca (o mitocondrial), la activación es intracelular. Se produce la liberación del citocromo-C mitocondrial en respuesta a estímulos intracelulares como el daño al DNA o el estrés celular. El citocromo-C se une a la

proteína APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1) y a la pro-caspasa 9, lo que constituye un complejo multimérico denominado “*apoptosoma*”. Esto conlleva un autoprosesamiento de la procaspasa 9 convirtiéndose en su forma activa como caspasa 9, que como caspasa iniciadora va a provocar la activación de la caspasa 3, y la consiguiente fragmentación del material nuclear [126-128] .

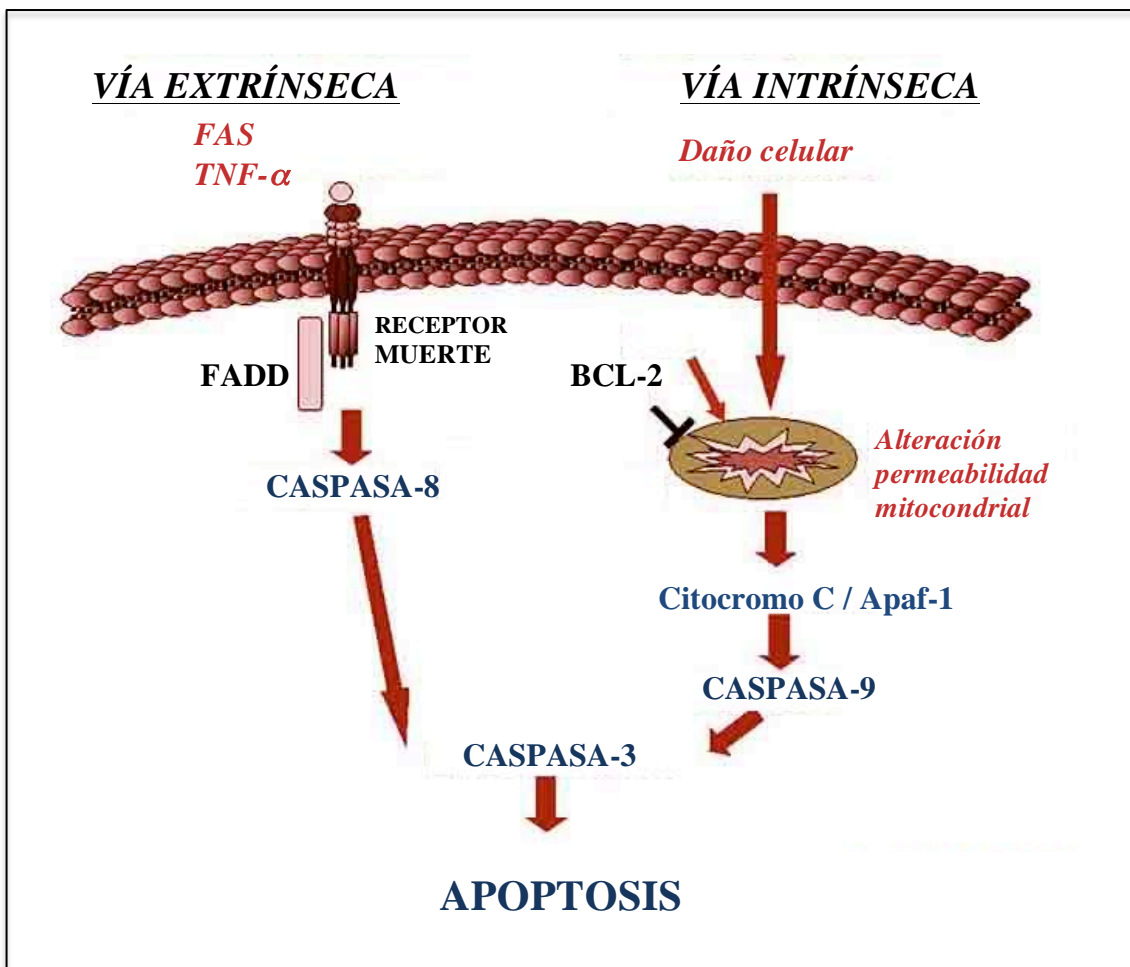


Figura 2: Vías de activación de la apoptosis

2.2.b) Proteínas de la familia BCL-2

La proteína BCL-2 (denominada por el proto-oncogén homónimo *B-cell lymphoma 2*) constituye uno de los principales reguladores de la vía intrínseca de la apoptosis. BCL-2 promueve la supervivencia celular mediante la inhibición de los procesos de permeabilización de la membrana mitocondrial externa, en los que el citocromo C se libera de la mitocondria a través de canales denominados MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel). Así pues, la familia de proteínas BCL-2 regula la apoptosis mediante el control de la formación del MAC.

Dentro de la familia BCL-2 hay identificadas al menos 15 proteínas con distintas funciones, pudiendo identificarse 3 subfamilias: la cohorte BCL-2 antiapoptótica, y las cohortes BAX y BH3 que son proapoptóticas. Las proteínas BAX (Bcl2-associated X protein) y BAD (Bcl2-associated death promoter) están muy implicadas en estos procesos de permeabilización mitocondrial. BAX interviene en la formación de canales iónicos en la membrana mitocondrial, que facilitan el paso de aniones y su despolarización, alterando la normal permeabilidad de la misma. Se ha demostrado mediante estudios moleculares e inmunológicos una relación directa entre la translocación y oligomerización de BAX, la formación del MAC y la liberación del citocromo-C de la mitocondria [129]. Así mismo, parece que la actividad del MAC esta atenuada con la utilización de anticuerpos de BAX que alteran su funcionalidad[130]. BAD se regula mediante fosforilación en respuesta a estímulos de muerte o supervivencia. En su forma no fosforilada forma un heterodímero con BCL-2 inhibiendo su función protectora de la membrana mitocondrial [131].

- Subfamilia Bcl-2 (anti-apoptótica): *Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, MCL-1, BCL2A1, BCL-B*
- Subfamilia Bax (pro-apoptótica): *Bax, Bak, Bok*
- Subfamilia BH3 (pro-apoptótica): *Bad, Bid, Bik, Blk, BimL, PUMA, NOXA, BMF, HRK*

Figura 3: Familia de proteínas Bcl-2

2.2.C) Apoptosis y daño pulmonar.

La implicación de la apoptosis en el daño pulmonar agudo viene determinada por la observación de su relación con la activación inflamatoria [132], con el estrés oxidativo [133], y con la ventilación mecánica [134]. Así mismo, se ha encontrado una activación de la apoptosis en relación al trauma vinculado a los procedimientos quirúrgicos [135, 136]. Por lo tanto, la implicación de la apoptosis en el DPA tras la CRP se produce por distintos mecanismos fisiopatológicos.

A pesar de que se habla de apoptosis como un modo de muerte celular que no se acompaña de inflamación, hay evidencia creciente de una relación estrecha entre ambos fenómenos. La activación y amplificación de la respuesta inflamatoria vía TNF- α y NF-KB parece aumentar la apoptosis de neumocitos tipo II en algunos modelos de DPA [137].

El papel de la apoptosis en el DPA se produce a distintos niveles, lo que determina en ocasiones efectos beneficiosos o perjudiciales. Por un lado la apoptosis de los neutrófilos, minimiza o limita la respuesta inflamatoria o inmunológica [68, 132]. Por otro lado, los fenómenos apoptóticos durante el DPA también afectan a las células epiteliales y endoteliales provocando un daño a la barrera alveolocapilar [138], con la consiguiente alteración en la permeabilidad a este nivel. Las citoquinas modulan el proceso apoptosis, así pues en sitios donde existe inflamación pulmonar la apoptosis de los neutrófilos se encuentra atenuada [139] mientras que la de las células epiteliales está aumentada [140].

El reclutamiento y la activación de neutrófilos debido al papel quimioatrayente de algunas citoquinas forma parte invariable del DPA postoperatorio, produciéndose una acumulación de estos en los pulmones, alcanzando los espacios aéreos.

Posteriormente la apoptosis de los neutrófilos minimiza la liberación de oxidantes y enzimas que provocan lesión celular, así éstos involucionan y son fagocitados por los macrófagos. Se ha identificado un aumento en los niveles de GM-CSF (*factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos*), que tiene un papel fundamental al inhibir la apoptosis de neutrófilos, lo que prolonga y potencia el proceso inflamatorio[68]. Por último se ha observado como la fagocitosis de estos neutrófilos apoptóticos afecta a la función de las células fagocíticas potenciando un cambio en la secreción de citoquinas proinflamatorias a anti-inflamatorias (IL-10), implicando por lo tanto a la apoptosis en la regulación de la respuesta inflamatoria e inmunológica [132].

La apoptosis de las células epiteliales alveolares ha sido implicada en varios modelos de DPA[140-144]. Normalmente las células epiteliales restringen el movimiento de fluidos y proteínas desde el intersticio al alveolo, y transportan de forma activa Na y Cl desde los espacios alveolares, con el correspondiente movimiento de agua a través de canales especializados (acuaporinas). Esta lesión epitelial y endotelial por lo tanto va a alterar la permeabilidad, provocando un edema con alto contenido en proteínas.

Así mismo se ha observado un aumento de FAS-L soluble en el LBA de los paciente que fallecieron por SDRA, y como además este LBA era capaz de inducir apoptosis en células epiteliales, efecto que además desaparecía al utilizar inhibidores específicos de la activación de FAS/FAS-L [145]. En un modelo animal se ha observado como la actividad del FAS-L, iniciando procesos de apoptosis caspasa-dependiente, se ha asociado de forma inversa a la integridad de barrera epitelial y se relaciona con la incapacidad para reabsorber fluidos desde los espacios aéreos[146]. También la instilación de FAS-L en pulmones de conejos se ha observado que puede causar hemorragia alveolar y producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-8,

por parte de los macrófagos alveolares [132]. La activación dependiente de FAS-L se ha observado que no se produce de forma constante en toda la vía aérea, observándose una susceptibilidad diferenciada en los neumocitos de las unidades alveolares más distales [147]. Los niveles de FAS-L en el lavado broncoalveolar se han asociado al daño multiorgánico y a un peor pronóstico en los pacientes con DPA Y SDRA[148-150].

Durante la respuesta inflamatoria se produce la secreción de algunos mediadores solubles (FAS-L, TNF- α) que inducen activación de los procesos apoptóticos [149]. Por otro lado, los receptores de la membrana celular comparten dominios (death domains) en ambas vías de señalización celular, lo que conlleva una interacción entre estas proteínas. Un ejemplo sería la estimulación de la vía del TNF-alfa, que determina una activación de fenómenos inflamatorios vía NF-Kb así como un efecto proapoptótico por la vía extrínseca [151]. Como vemos la activación de ambos fenómenos comparte vías de regulación.

La actividad de BAX en los neumocitos alveolares de tipo 2 se ha observado incrementada en los casos de DPA [152] (lo cual sugeriría una susceptibilidad aumentada de estas células epiteliales a la apoptosis). Parece que, en definitiva, el balance de la actividad BAX/BCL-2 determinaría la susceptibilidad de las células del epitelio alveolar a la apoptosis [153, 154]. En un trabajo previo de nuestro equipo, hemos observado cómo el efecto protector de la lidocaína intravenosa en un modelo de DPA asociado a la CRP, se encontraba en relación a una disminución de los niveles de BAX y un incremento en la actividad de BCL-2 [97]. Así mismo, encontramos como el DPA asociado a la cirugía se asociaba a un aumento de mediadores inflamatorios y de apoptosis como las caspasas 3 y 9.

En los últimos años se ha observado como los procesos de apoptosis pueden tener una importancia relevante en la lesión pulmonar por isquemia-reperfusión (LPIR) que se va a presentar a la finalización de la OLV [155]. Ya se conocía del papel que los neutrófilos, radicales libres de oxígeno y otros mediadores de los procesos inflamatorios tenían en los procesos de isquemia-reperfusión, estos procesos celulares provocan la muerte de células del parénquima pulmonar por procesos de necrosis, íntimamente ligada a los fenómenos inflamatorios. Sin embargo se ha observado como la apoptosis también tiene un papel importante asociada a la LPIR [156]. Al ser un proceso que precisa de energía, resulta congruente que no se produzca de forma relevante durante la isquemia donde no tendrá un aporte adecuado de ATP a la célula, sino durante la reperfusión, con un pico a las 2 horas [157, 158].

También sabemos que las células epiteliales pueden desaparecer por necrosis, debido a las fuerzas de cizallamiento que impone la ventilación mecánica, lo que puede alterar la integridad de la membrana celular [159]. La importancia relativa de los procesos necróticos y apoptóticos en la destrucción del epitelio alveolar en el DPA tiene todavía que ser clarificada.

La influencia de la apoptosis en los procesos inflamatorios pulmonares, ha sido estudiada y se ha observado como tiene un papel central y clave en el daño pulmonar agudo, y probablemente su inhibición tiene un papel protector en este proceso inflamatorio[160]. Sin embargo, aunque ciertos estudios indican un efecto beneficioso de la inhibición de las vías de la apoptosis en el SDRA [144, 161], su efectividad dependería de las células sobre las que actúe esta inhibición.

2.4) MICRO-RNAS

Un microRNAs (miRNA) es un cadena única de ácido ribonucleico, de pequeña longitud (21 a 25 nucleótidos) que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes. Mediante el sistema de la “ribointerferencia”, las células de los organismos vivos controlan qué genes están activos en un momento determinado, y en uno u otro tipo celular, así como su grado de activación [162]. En este mecanismo, hay un silenciamiento post-transcripcional de genes específicos ejercido por estas moléculas de miRNA, que se unen por complementariedad de secuencias a las regiones 3'-UTR de un ARN mensajero (mRNA), impidiendo la traducción de este y conduciendo a su represión traslacional o a su degradación[163].

La función de los miRNAs está relacionada con la regulación de la expresión génica, así pues parece que hasta el 70% de los genes en humanos podrían estar regulados de forma específica por los miRNAs. Un mismo miRNA puede unirse a varios mRNAs, y a su vez el silenciamiento de un mRNA puede ser realizado por varios miRNAs[164]. Esto complica la identificación de una función concreta y aislada en cada miRNA de forma específica, pero parece claro que constituyen un novedoso mecanismo regulatorio de la expresión génica. Este mecanismo de regulación genética puede modular múltiples procesos fisiológicos y patológicos, y desde una etapa preclínica, lo que los hace unos adecuados biomarcadores potenciales en distintas circunstancias.

En los últimos años, han sido implicados en la regulación de la respuesta inmunológica [165], la apoptosis [166, 167] y los fenómenos de isquemia-reperfusión a nivel de corazón [168, 169], cerebro [170, 171] , hígado [172] o riñón [173, 174]. Así mismo, decenas de miRNAs han sido implicados en distintos procesos patológicos a

nivel pulmonar como asma [175], EPOC, fibrosis quística, fibrosis pulmonar[176], hipertensión pulmonar primaria [177], así como en la respuesta inflamatoria asociada al DPA/SDRA[178].

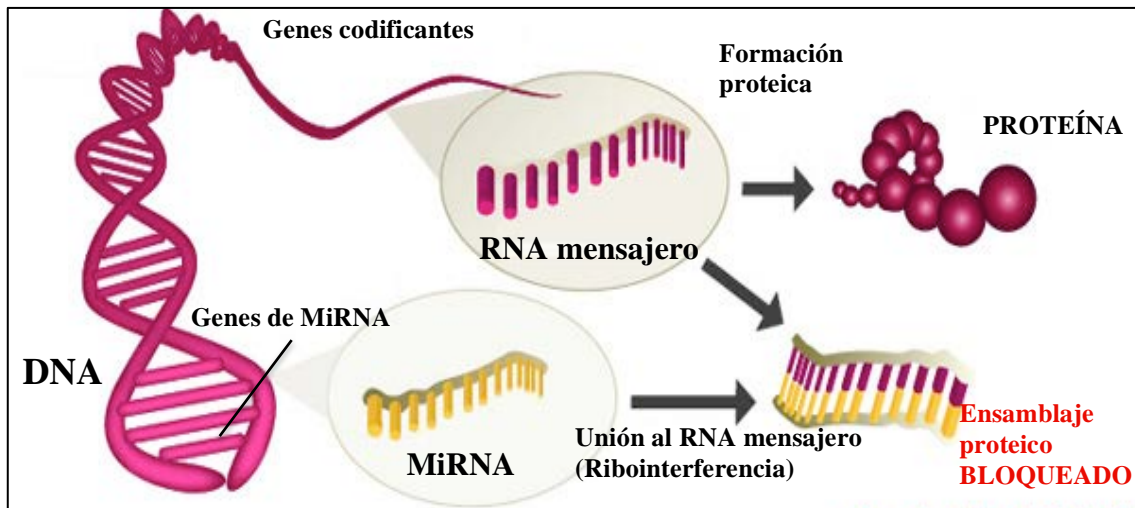


Figura 4: Mecanismo de acción de los MiRNA.

En los procesos inflamatorios se observa un aumento de distintos microRNAs en respuesta al aumento de algunas citoquinas como IL-1 o TNF- α [179-181]. El papel de los microRNAs en la regulación de la respuesta inflamatoria mediante la modulación de la expresión de citoquinas puede ser proinflamatorio o antiinflamatorio. Como muestra, se ha observado un efecto proinflamatorio del miR-155, asociado a una inhibición de los procesos moleculares implicados en la supervivencia celular, el crecimiento y la migración celular[182-184]. Por otro lado, existe un efecto antiinflamatorio del miR-146 [185, 186], que provocaría un feedback negativo en la secreción de IL-1 y TNF- α [187]. Ratones deficientes de miR-146 presentan una respuesta inflamatoria exacerbada ante distintos estímulos, con una muy elevada secreción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6)[188].

Respecto a la apoptosis se ha observado como el miR-192 [189] puede inducir apoptosis, mientras que el miR-21 tiene un papel antiapoptótica en relación a la inactivación de la vía FAS/FAS-L de la vía extrínseca [166]. Por otro lado, en la vía intrínseca de la apoptosis, parece que el miR-29 podría modular la actividad de la familia de proteínas BCL-2 en un modelo de isquemia cerebral [167].

Como vemos, parece probable que estos microRNAs tengan un papel relevante en el DPA asociado a la CRP, donde los fenómenos inflamatorios, apoptóticos y de isquemia-reperfusión están invariablemente presentes. Algunos que habían sido previamente implicados en procesos inflamatorios (miR-146), se han asociado al DPA [190]. Un modelo de DPA asociado a la ventilación mecánica con altos volúmenes corrientes han descrito cambios en la expresión de distintos miRNA con un aumento en la expresión de miR155, miRlet7d y miR146 [191]. Así mismo, se observa un beneficio respecto al grado de permeabilidad alveolo-capilar de la VILI al ser bloqueados por antagonistas específicos algunos de estos miRNAs[192].

En otros modelos, sin embargo, como en la lesión pulmonar inducida por bleomicina en ratas, se observó una disminución de los niveles de MiR-127 [193], así mismo se observó como la sobreexpresión de este MiRNA puede prevenir una respuesta inflamatoria exagerada durante una agresión al tejido pulmonar [194]. Otros como el miR-16 ha sido implicado en la resolución del edema en el DPA [195], así como en promover una regulación a la baja de los niveles de IL-6 y TNF- α en modelo de DPA [196].

Como vemos, la modulación de la respuesta inflamatoria en el pulmón, se ve influenciada por el balance entre la actividad de miRNAs con efectos opuestos. Aún no se conoce de forma precisa como los miRNAs influyen de manera específica cada componente de la respuesta inflamatoria (activación leucocitaria, expresión de

citoquinas o activación endotelial). La posibilidad de que un mismo miRNA actúe sobre la expresión de distintos genes, hace aún más difícil determinar de manera específica la función pro o antiinflamatoria de cada uno de ellos. También se ha propuesto su antagonismo mediante antago-miRNAs como posibilidad terapéutica en patología inflamatorias[180], pero antes deberíamos conocer el efecto específico de un miRNA concreto en una determinada patología para saber si es una diana terapéutica adecuada. Como vemos, se necesita una mejor comprensión del efecto de cada miRNA y de cómo interaccionan para modular la respuesta inflamatoria, para conseguir determinar el papel específico de cada uno de ellos.

	MiRNA	Proceso Biológico	Tejido	Modelo
Dharap 2009 ^[170]	MiRNA 145	Necrosis isquémica (+)	Cerebro	Ratas (in-vivo)
Sayed 2010 ^[166]	MiRNA 21	Apoptosis (inhibidor)	Corazón	Ratas (in-vitro)
Feng 2011 ^[189]	MiRNA 192	Apoptosis (activador)	Pulmón	Humano (in-vitro)
Yu 2009 ^[172]	MiRNA 223	SIR (+)	Hígado	Ratas (in vitro)
Shapiro 2011 ^[173]	MiRNA 21 y 146	SIR (+)	Riñón	Ratas (in vivo)
Perry 2008 ^[186]	MiRNA 146	Respuesta inflamatoria (-)	Pulmón	Ratas (in vitro)
O'Connel 2007 ^[179]	MiRNA 155	Respuesta inflamatoria (+)	Mieloide	Humano (in vitro)
Taganov 2006 ^[187]	MiRNA 146	Respuesta inflamatoria (-)	Mieloide	Humano (in-vitro)
Boldin 2011 ^[188]	MiRNA 146	Respuesta inflamatoria (-)	Mieloide	Ratas (in vivo)
Vaporidi 2012 ^[191]	MiRNA 21 / let 7d / 146	Respuesta inflamatoria (VILI)	Pulmón	Ratas (in vivo)
Yehya 2012 ^[192]	MiRNA 466	Respuesta inflamatoria (VILI) (+)	Pulmón	Ratas (in-vitro)
Xie 2012 ^[194]	MiRNA 127	Respuesta inflamatoria (-)	Pulmón	Ratas (in-vitro)
Tamarapu 2012 ^[195]	MiRNA 16	Permeabilidad alveolar (-)	Pulmón	Ratas (in-vivo)
Cai 2012 ^[196]	MiRNA 16	Inflamación inducida por lipopolisacárido (-)	Pulmón	Humanos (in-vitro)

Tabla 1. Estudios que relacionan los MiRNAs con distintos procesos moleculares.

2.5) EDEMA

Como ya se ha comentado previamente el DPA y el SDRA implican un edema pulmonar no cardiogénico, que se produce como consecuencia de una alteración de la normal funcionalidad de barrera alveolocapilar en el transcurso de la lesión del tejido pulmonar. Independiente de la etiología de este cuadro, ya sea por una noxa pulmonar (aspiración, neumonía, traumatismo, tromboembolismo...) o sistémica (politraumatismo, transfusión, pancreatitis, quemados, sepsis) los pacientes comparten un cuadro clínico así como las alteraciones histopatológicas comunes. Se presenta clínicamente como un cuadro de insuficiencia respiratorio agudo o subagudo con un descenso en la relación PaO_2/FiO_2 que obliga a instaurar algún tipo de soporte ventilatorio con aumento de la FiO_2 para revertir la hipoxemia.

Como ya hemos visto anteriormente, el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria importante así como su asociación con fenómenos de apoptosis, o daño por estrés oxidativo ocasiona una alteración de las células de epitelio y endotelio alveolar, con la consiguiente alteración de la adecuada funcionalidad de la barrera alveolocapilar. Se produce un aumento de la permeabilidad y un exudado alveolar que condiciona hipoxemia por “efecto shunt” y una alteración de la distensibilidad pulmonar. En este caso el edema alveolar no se produce por un aumento de la presión hidrostática capilar (edema pulmonar cardiogénico) sino por una alteración de la permeabilidad de la barrera.

Durante un procedimiento quirúrgico de resección pulmonar ambos pulmones sufren agresiones que favorecen el desarrollo de edema pulmonar. Por un lado la posición en decúbito lateral (por efecto de la gravedad) y la VPH durante la OLV,

condicionan el mayor flujo sanguíneo que recibe el pulmón declive, aumentando la presión hidrostática en el lado vascular. Por otro lado, la cirugía de resección sobre el pulmón no dependiente condiciona una agresión al tejido pulmonar y los vasos sanguíneos del mismo que favorecen el DPA [2, 21]. En este último caso, el pulmón no dependiente, también se afectará como hemos comentado anteriormente por el efecto de isquemia-reperfusión que condiciona la OLV.

Los marcadores de estrés oxidativo y de daño pulmonar son mayores en pacientes a los que se realiza neumonectomía, modestas en lobectomías y leves en segmentectomías o cuñas[50], lo cual refuerza la importancia del aumento del flujo en el tejido pulmonar residual que puede inducir o agravar un daño pulmonar subyacente [2]).

Si bien en la práctica clínica habitual desde hace años el agua extravascular pulmonar (ELWI) ha sido utilizado para medir precozmente el edema pulmonar [197, 198] en animales la medición de este edema ha sido tradicionalmente mediante la cuantificación del mismo en muestras de tejido pulmonar [199].

3) SEVOFLURANO

El sevoflurano, es un líquido volátil, derivado fluorado del metil-isopropil-éter que contiene siete átomos de flúor (halógeno). Es uno de gases anestésicos más ampliamente utilizado en la clínica. La ausencia de irritación de la vía aérea superior y su rápido incremento en la concentración anestésica lo hacen muy adecuado para las inducciones anestésicas inhalatorias.

Así mismo, su baja solubilidad en sangre da lugar a una elevación rápida de su concentración alveolar (captación) y a una disminución rápida en la concentración del anestésico al interrumpirlo (eliminación), con un despertar precoz respecto a otros gases halogenados.

Respecto a su farmacodinamia, el sevoflurano tiene efectos en distintos órganos: A nivel respiratorio produce una depresión ligera, con disminución del volumen corriente y aumento de la frecuencia respiratoria. La inhibición simpática asociada tiene un efecto inotrópico negativo a nivel cardiaco, con reducción del gasto cardiaco. A nivel cerebral, produce un ligero incremento relativo en el flujo sanguíneo cerebral con la consiguiente elevación de la presión intracraneal, y a dosis altas puede alterar la autorregulación del flujo sanguíneo cerebral. En el riñón aumenta ligeramente el flujo sanguíneo, y existe una potencial toxicidad renal al metabolizarse las moléculas de flúor, que no ha sido demostrada de manera consistente en humanos. A nivel hepático, reduce el flujo portal a la par que aumenta el flujo desde la arteria hepática, lo que mantiene constante el aporte de oxígeno a los hepatocitos.

Durante la OLV, el efecto del sevoflurano sobre la VPH es controvertido. Si bien otros gases como el óxido nitroso o el halotano producen una inhibición dosis-

dependiente de la VPH, el efecto de otros halogenados más modernos como el sevoflurano parece mas discutible. Actualmente se considera que, a las concentraciones utilizadas en clínica, tiene un efecto neutro [200]. En estudios comparativos in vivo de oxigenación arterial durante la OLV, el mantenimiento anestésico con sevoflurano respecto a Propofol no se ha asociado a diferencias significativas [201-203]. Sin embargo estudios in vitro y con pulmón denervado sí ponen de manifiesto una inhibición de la VPH concentración dependiente [204].

a) Efecto citoprotector del sevoflurano:

De cara a proteger los órganos frente a los fenómenos de isquemia-reperusión, se han intentado establecer distintos tipos de terapias preventivas para atenuar este daño celular (Técnicas de preconditionamiento). El preconditionamiento puede realizarse de forma mecánica provocando pequeños ciclos de isquemia, denominado preconditionamiento isquémico, con buenos resultados tanto a nivel pulmonar [205] como hepático [206]. Otro modo sería el preconditionamiento farmacológico. Se ha demostrado la eficacia con la utilización de antagonistas del calcio como el amlodipino [207] o con ketoralaco en el corazón [208], o también en caso del riñón, donde se ha observado en cerdos una mejora en la función renal post-isquemia cuando se utilizó nimodipino [209]. El sevoflurano, al igual que otros halogenados (preconditionamiento anestésico), también tiene un papel importante debido a sus efectos citoprotectores.

Los mecanismos precisos por los que estos agentes ejercen la protección frente a la isquemia, no parecen deberse en exclusiva al mejor balance entre el aporte y el consumo de oxígeno derivado de sus efectos hemodinámicos. A nivel miocárdico, se ha objetivado además que los gases halogenados producen la apertura de canales de

K⁺ATP-dependientes mitocondriales y sarcolémicos [210], al tiempo que reducen la sensibilidad de éstos para cerrarse por ausencia de ATP[211], aumentando así la probabilidad de que permanezcan abiertos. Esta apertura de los canales de K dependientes de ATP va a provocar en el músculo liso de los vasos coronarios una vasodilatación, lo cual va a mejorar el aporte de oxígeno, y en cierto modo protege durante la isquemia cuando la producción de ATP se ve reducida. Además el sevoflurano induce un incremento de la circulación colateral mediado por los canales de K⁺ calcio dependientes[212]. Se ha demostrado con anterioridad que los anestésicos halogenados podían proteger contra el daño postreperusión en el corazón[213], cerebro[214] e hígado [215].

A nivel pulmonar existen menos investigaciones, aunque se ha comprobado en el pulmón del conejo que la administración de isoflurano o sevoflurano antes de la isquemia atenúa el aumento de la permeabilidad vascular y la relación peso húmedo/seco, disminuye los niveles de TNF- α así como los metabolitos del pulmón reperfundido después de la isquemia [216]. El sevoflurano también ha demostrado, en un modelo in vitro, disminuir el aumento de la permeabilidad endotelial pulmonar inducido por TNF- α , asociado a un efecto inhibitor sobre la vía de las MAPK (Mapk-p38)[217]. Los efectos protectores del sevoflurano a nivel pulmonar en este caso, parecen ponerse en relación con una atenuación de la respuesta inflamatoria y la lesión asociada. El efecto protector pulmonar del preconditionamiento con sevoflurano, también se ha observado al atenuar la lesión pulmonar que puede desencadenarse tras el SIR de los miembros inferiores en cirugía aórtica[218]. Así mismo, en un estudio en humanos sometidos a by-pass cardiopulmonar, la administración de sevoflurano ha demostrado disminuir los niveles de neutrófilos y citoquinas proinflamatorias a nivel pulmonar [219].

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado previamente un efecto beneficioso del preconditionamiento anestésico con sevoflurano sobre el síndrome isquemia-reperfusión a nivel pulmonar [220]. El estudio se realizó en un modelo de autotrasplante pulmonar en cerdos, realizando una neumonectomía y posterior autotrasplante de un lóbulo pulmonar. En este caso el sevoflurano, administrado antes del daño isquémico, disminuyó la respuesta inflamatoria asociada al procedimiento, la infiltración leucocitaria, así como los marcadores de estrés oxidativo estudiados. Estos efectos moleculares también se acompañaron de una mejor oxigenación en el grupo de estudio tratado con sevoflurano, reflejando un menor grado de edema pulmonar. En otra investigación posterior, hemos observado como la afectación hepática inflamatoria, que aparece como resultado de la liberación de mediadores por el SIR pulmonar, se atenúa con la administración de sevoflurano [221]. Esto revela un efecto beneficioso respecto a la afectación pulmonar y sistémica derivada de la inflamación por SIR pulmonar.

Previamente, en una línea de trabajo paralela, ya hemos estudiado el efecto de otras terapias farmacológicas como la perfusión intravenosa de lidocaína sobre la respuesta inflamatoria y apoptótica ligada a la CRP con OLV con resultado favorables [97]. La utilización de lidocaína intravenosa atenuó la respuesta inflamatoria y apoptótica tanto en el pulmón intervenido como en el sometido a OLV, así como a nivel sistémico.

Estos resultados nos han llevado a reforzar la idea acerca de la utilización de fármacos con actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora conocida de cara a atenuar la respuesta inflamatoria en la CRP, y por consiguiente disminuir la frecuencia y la gravedad del DPA postoperatorio. A la luz de los resultados, se planteaba la potencial utilidad que tendría el sevoflurano sobre la respuesta inflamatoria secundaria a la CRP con OLV, donde invariablemente se produce un SIR asociado.

En un modelo animal de SDRA, el sevoflurano también ha demostrado disminuir la respuesta inflamatoria y mejorar la oxigenación respecto al propofol [222]. Durante la OLV para la CRP en humanos, la administración de sevoflurano respecto a propofol parece que disminuye la concentración sanguínea de marcadores de estrés oxidativo 6 horas después de re-establecer la ventilación bipulmonar [223]. En otros estudios comparativo entre sevoflurano y propofol en cirugía torácica, donde se recogían muestras de LBA del pulmón no ventilado y sanguíneas, se objetivó como el sevoflurano se asociaba a un menor aumento de mediadores inflamatorios (IL-1 β , TNF- α , IL-6) tras la OLV así como a un menor índice de complicaciones postoperatorias [224, 225]. Estos estudios reflejan muy bien el probable papel del sevoflurano como inmunomodulador durante la OLV. Sin embargo, estos hallazgos no se han visto confirmados en investigaciones posteriores que encuentran resultados opuestos en pacientes sometidos a cirugías de resección pulmonar, con un respuesta inflamatoria acentuada y mayor daño pulmonar en el grupo que recibió la administración de sevoflurano [226].

Como vemos el papel del sevoflurano en la cirugía de resección pulmonar, como citoprotector y modulador de la respuesta inmune asociada a la OLV, no está por el momento plenamente establecido.

HIPÓTESIS

Durante la cirugía de resección pulmonar con ventilación unipulmonar existe una respuesta inflamatoria local, que provoca una lesión orgánica con aumento del grado de edema pulmonar. Esta respuesta inflamatoria probablemente es resultado de tres factores: la ventilación unipulmonar, el colapso y re-expansión pulmonar, y la propia manipulación quirúrgica. La administración de sevoflurano durante la cirugía podría atenuar esta respuesta inflamatoria asociada.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar un posible efecto modulador del sevoflurano sobre la respuesta inflamatoria y el daño pulmonar agudo secundario a la cirugía de resección pulmonar en un modelo experimental en cerdos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar el efecto del sevoflurano sobre la respuesta inflamatoria pulmonar a las 24 horas de la cirugía de resección pulmonar.
- Evaluar el efecto del sevoflurano sobre la apoptosis en el tejido pulmonar a las 24 horas de cirugía.
- Evaluar la implicación de los microRNAs en la respuesta inflamatoria pulmonar asociada a la cirugía de resección pulmonar, así como modulación con Sevoflurano.
- Evaluar la degradación del glicocálix endotelial tras la cirugía de resección pulmonar, así como su modulación por Sevoflurano.
- Determinar la influencia aislada de la ventilación unipulmonar en la respuesta inflamatoria pulmonar a las 24 horas.
- Determinar la influencia aislada del procedimiento quirúrgico sobre la respuesta inflamatoria pulmonar a las 24 horas.
- Evaluar el efecto que ejerce administración de sevoflurano sobre el estado hemodinámico y gasométrico durante la cirugía de resección pulmonar y a las 24 horas posteriores.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) MODELO ANIMAL Y GRUPOS DE ESTUDIO:

Se realizó un estudio prospectivo aleatorizado, realizado en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y en el Laboratorio de Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Previamente se obtuvo la aprobación por el comité de experimentación animal y de investigación de la institución, los animales fueron manejados de acuerdo a la normativa europea y española respecto a la manipulación y cuidado de animales de experimentación, con especial énfasis en el manejo anestésico y el alivio del dolor.

Veinte cerdos de la raza mini-pig con un peso medio de 36 ± 10 Kg. fueron sometidos a una toracotomía izquierda para realizar una lobectomía caudal. Se dividieron en cuatro grupos de 5 animales cada uno: Sevoflurano (SEVO), Control (CON), Sham-A y Sham-B, asignados aleatoriamente con ayuda del programa Excel (Microsoft Corp, Seattle, WA). El grupo de sevoflurano recibió la administración del gas halogenado después de la inducción anestésica hasta la finalización de la cirugía y la educación, los otros 3 grupos recibieron mantenimiento anestésico mediante anestesia total intravenosa (TIVA) con propofol. Al grupo Sham-A se le realizó una toracotomía izquierda sin OLV ni lobectomía caudal. Al grupo Sham-B, se le realizó una toracotomía izquierda sin resección pulmonar, pero con un periodo de OLV asociado.

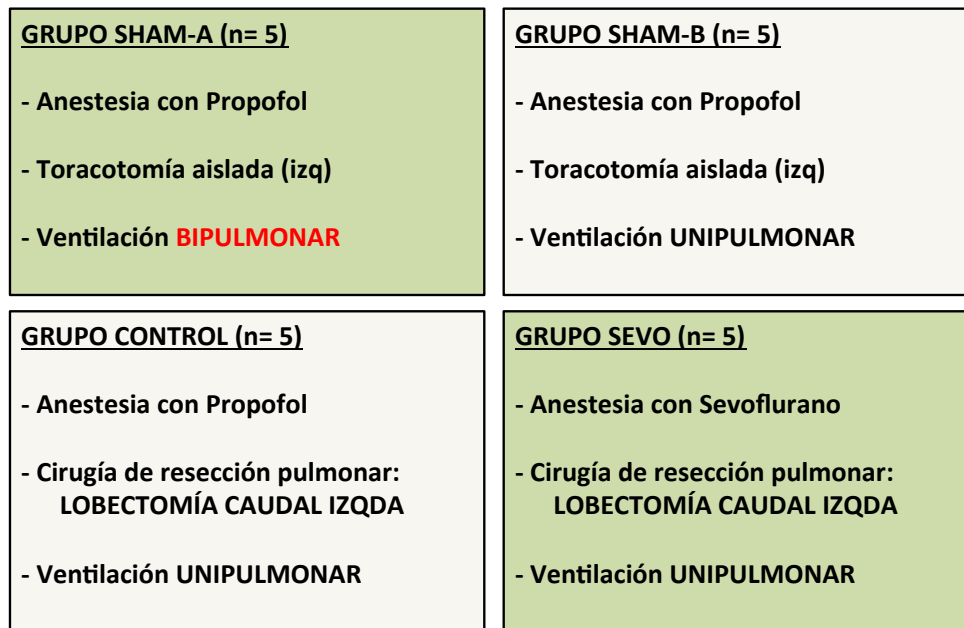


Figura 2: GRUPOS DE ESTUDIO

2) PROTOCOLO ANESTÉSICO:

Todos los animales recibieron el mismo protocolo anestésico. Ayunas de 18 horas para sólidos y libre acceso al agua. Se administró a premedicación 30 minutos antes del procedimiento a los animales, en la jaula, con 10 mg/kg de ketamina intramuscular (Ketolar®, Parke Davis, Pfizer, Dublin, Irlanda). Posteriormente se realiza el traslado al quirófano donde una vez colocados en posición supina se monitorizan con pulsioxímetro y electrocardiógrafo. Se canaliza una vena periférica en pabellón auricular (abbocath 20 G). La inducción se realiza con fentanilo 3 ug/Kg (Fentanest, Kern Pharmaceuticals, Houston, Texas), propofol 3 mg/Kg (Diprivan, AstraZeneca, Macclesfield, Cheshire, Reino Unido), y atracurio 0,6 mg/Kg (Tracrium,

Glaxo Smith Kline, Brentford, UK). Se realiza profilaxis antibiótica con penicilina benzatínica. El mantenimiento anestésico se realizó con perfusión continua de propofol 10 mg/Kg/h con bomba de infusión en el grupo CON, Sham-A y Sham-B. En el grupo SEVO se administró sevoflurano (Sevorane, Abbott laboratories, Madrid, Spain) al 2% mediante el dispositivo AnaConDa™ (Sedana Medical, Upsala, Sweden) durante todo el procedimiento. Se administraron bolos de fentanilo 2ug/Kg según las necesidades analgésicas y atracurio para optimizar la relajación muscular. La fluidoterapia se realizó con Ringer lactato en perfusión continua a 5 ml/Kg/h también con bomba de infusión. Se realizó intubación orotraqueal con tubo 6-7 mm con neumotaponamiento y se colocó 3 cm sobre la carina durante la ventilación bipulmonar (por encima del bronquio traqueal) guiado con fibrobroncoscopio. Durante todo el procedimiento se realizó una estrategia de ventilación de protección pulmonar con volúmenes corriente bajos 8 ml/Kg y 6 ml/Kg en ventilación unipulmonar, presión pico menos de 35 cm H₂O y PEEP de 5 cm de H₂O con FiO₂ 0,6. La frecuencia respiratoria fue entre 10 y 14 respiraciones por minuto para mantener pCO₂ arteriales entre 35 y 45 mm Hg y una relación 1:2 entre inspiración y espiración. Se monitorizó la presión pico, media y complianza de forma continua durante todo el experimento. El bloqueo pulmonar selectivo para la OLV se realizó introduciendo el tubo endotraqueal hasta el bronquio principal derecho guiado con el fibrobroncoscopio antes de abrir la pleura izquierda. La OLV se mantuvo durante 120 minutos, después el tubo se retiró hasta la tráquea verificando su posición con fibrobroncoscopio. La perfusión de propofol se detuvo cuando los cirujanos empiezan a cerrar la toracotomía, se despierta al animal y después de comprobar una ventilación espontánea adecuada, con una frecuencia respiratoria en rango normal y oxigenación correcta se procede a la extubación. En el postoperatorio se

administran Ketorolaco y dexketoprofeno como medicación analgésica y se deja libre acceso al agua.

A las 24 horas del postoperatorio el animal es trasladado nuevamente al quirófano donde se vuelve a realizar una inducción anestésica de las mismas características. El mantenimiento anestésico se realiza en este caso con propofol en perfusión continua en los 4 grupos. A la finalización del procedimiento con la recogida de muestras, el animal es sacrificado tras la administración de un bolo de propofol de 2 mg/kg para conseguir un plano profundo de hipnosis y a la inducción de cardioplejia con la administración de cloruro potásico.

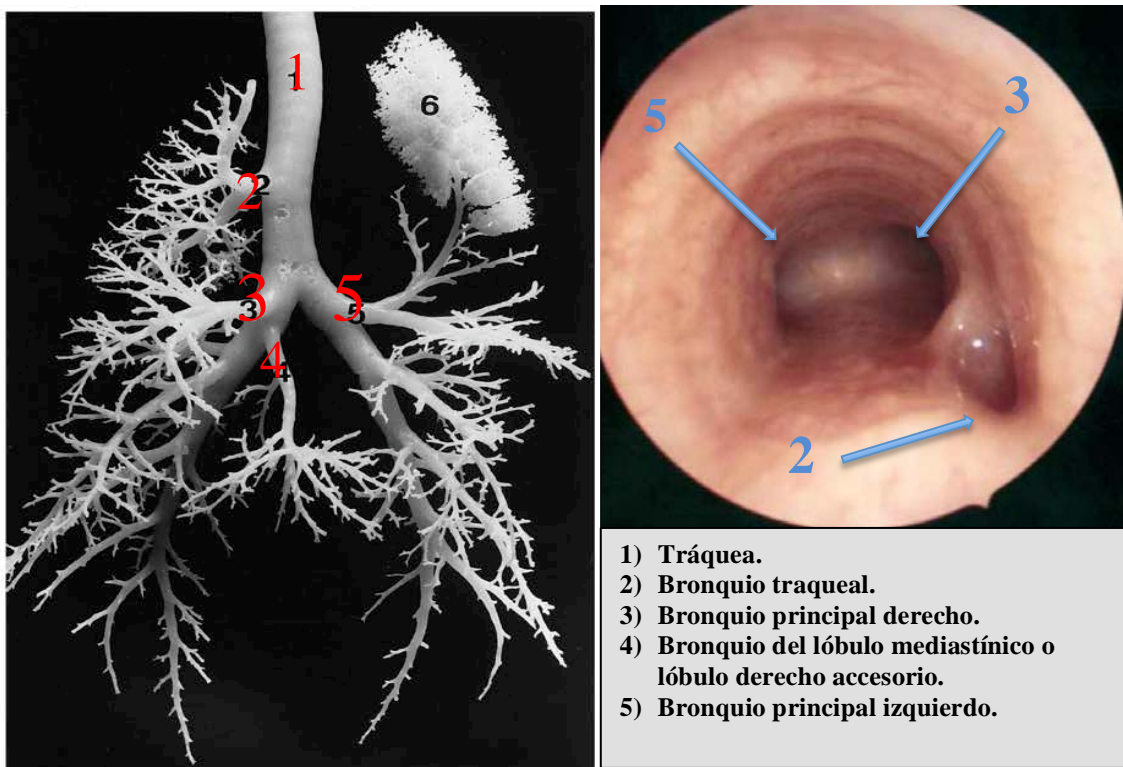


Figura 3: Anatomía bronquial del cerdo.

3) PROTOCOLO QUIRÚRGICO:

Después de la inducción anestésica y canalización de vías femorales se coloca al animal en decúbito lateral derecho. Se procede a la limpieza de la zona con povidona iodada y al aislamiento del campo quirúrgico. Con técnica estéril se realiza una toracotomía izquierda entre la quinta y la sexta costilla. Posteriormente con el animal en OLV se realizó una lobectomía caudal con una duración inferior a 120 minutos. La disección se realizó a través de la cisura interlobar, identificando y ligando vena, arteria y bronquio caudal. Luego de 120 minutos se reinicia la ventilación bipulmonar y se revisa la correcta expansión del lóbulo superior y la estanqueidad de la sutura bronquial. Luego se coloca un tubo de drenaje torácico conectado a una válvula unidireccional (Heimlich) y se cierra la toracotomía.



Imagen 1: Quirófano de cirugía experimental.

En los grupos Sham-A y Sham-B se le realiza el mismo protocolo pero sin lobectomía, asociando OLV en el grupo Sham-B. Después de 24 horas se realiza una nueva anestesia general siguiendo el mismo protocolo y monitorización descrito anteriormente seguido de una toracotomía izquierda y se recogen muestras de el lóbulo superior izquierdo y de el lóbulo mediastínico (parte del pulmón derecho, y sometido a OLV).

4) MEDICIONES REALIZADAS:

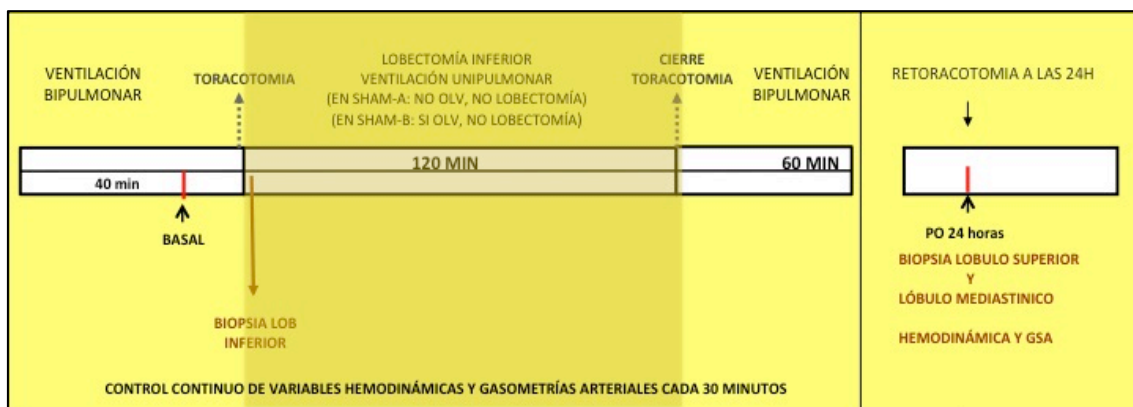
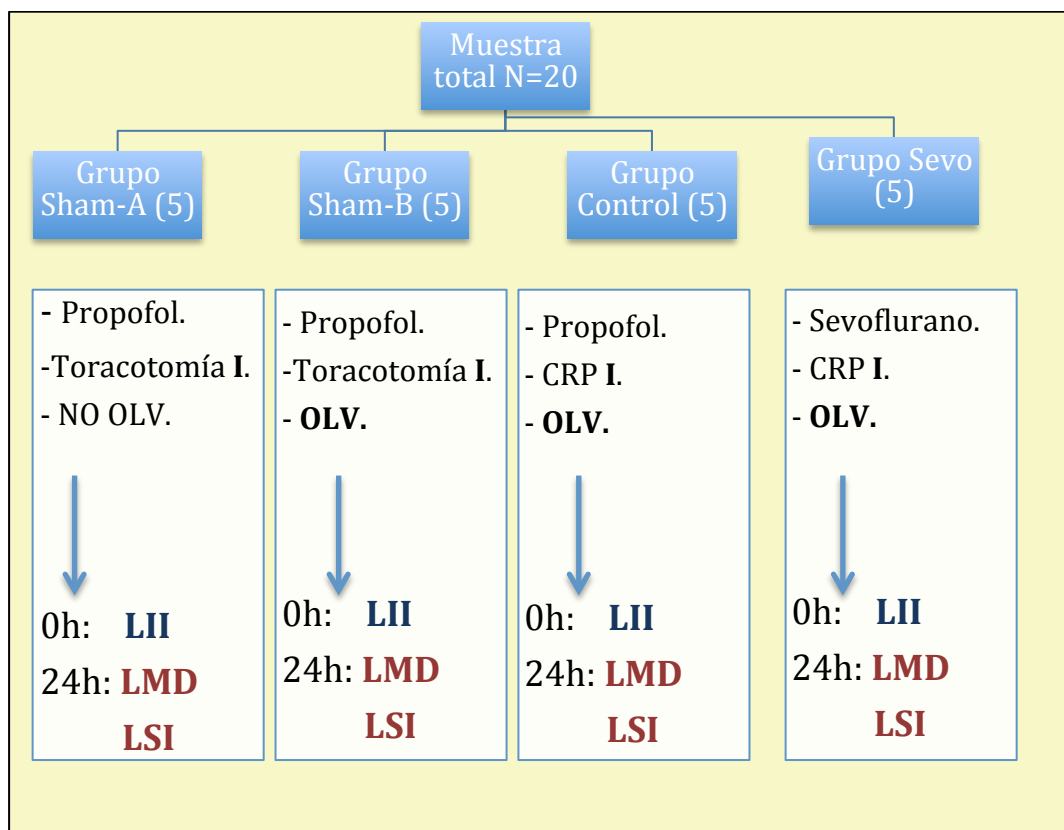


Figura 6 Mediciones durante el estudio

- **Control continuo de variables hemodinámicas y gasometrías arteriales.**
- **Biopsias pulmonares primer día:** Lóbulo inferior izquierdo (LII)
- **Biopsias pulmonares segundo día:** Lóbulo superior izquierdo (LSI) y Lóbulo mediastínico derecho (LMD)



4.1) PARÁMETROS HEMODINÁMICOS Y GASOMETRÍAS ARTERIALES

Tras la inducción anestésica se canalizaron la vena y arteria femoral derecha con catéteres de Arrow-Howes 7 Fr.. Para ello se procedió a realizar una disección inguinal hasta visualizarlas y técnica de Seldinger, a través de los mismo se introduce un catéter trilumen y un catéter de termodilución PiCCO (PV2014L16 arteria femoral de adulto pequeño Ø 4F, longitud 16 cm). Se monitorizaron las principales variables hemodinámicas para valorar precarga (GEDV: *global end diastolic volume*), postcarga (RVS: *resistencias vasculares sistémicas*), contractilidad (dPmx), respuesta a fluidos (VVS: *variación de volumen sistólico*) y edema pulmonar (ELWI: *extravascular lung water index*) con ayuda del monitor de termodilución PiCCO-Pulsion (**Pulsion**

Medical Systems, Munich, Alemania). Se realizaron gasometrías tomadas de la arteria femoral en cinco momentos diferentes, basal, después de 30 minutos de ventilación unipulmonar (30' OLV), a los 120 minutos de ventilación unipulmonar (120' OLV), 60 minutos después de reiniciar la ventilación bipulmonar (60' TLV) y 24 horas después de la lobectomía (24h).

4.2) BIOPSIAS PULMONARES:

Se realizaron biopsias de tejido pulmonar para realizar los estudios bioquímicos. Todas las muestras de tejido pulmonar fueron procesadas en criotubos, ultracongeladas en nitrógeno líquido inmediatamente y almacenadas a -80°C hasta que se realizaron los análisis bioquímicos.

- Estudio del edema pulmonar:

La gravimetría es considerada la técnica gold estándar para medir el edema pulmonar, y consiste en ver la relación entre el peso húmedo y el peso seco en una muestra (462). Para cuantificar la relación húmedo a seco se tomaron aproximadamente 50 mg de cada muestra de pulmón se incubaron 12 horas a 60°C y se pesaron nuevamente. Los valores obtenidos se analizaron con la siguiente fórmula: $(\text{peso húmedo} - \text{peso seco}) / \text{peso húmedo}$.

- ICAM-1 y Syndecan-1:

Se midieron por un método inmunoenzimático utilizando Kits de ELISA específicos para cerdos (Cusabio Biotech Co Ltd, China).

El fundamento de este método se basa en la unión específica de la proteína contenida en la muestra a anticuerpos monoclonales específicos inmovilizados sobre la superficie de placas de titulación. Para ello las muestras y estándares apropiados se incuban con el anticuerpo. Después de un lavado para eliminar todas las sustancias no unidas que pudiesen interferir con el ensayo, se añade un segundo anticuerpo específico para el primero y conjugado con biotina y se realiza una segunda incubación. Tras la eliminación por lavado del segundo anticuerpo no unido, se incubaron de nuevo en presencia de un complejo estreptavidina peroxidasa y se cuantificó la citoquina unida por una reacción enzimática que originó cambios de color detectables en el espectrofotómetro.

- Expresión de proteínas (IL-1, TNF- α , Caspasa-3, BAX, BAD, BCL-2):

Se realizó por Western-blot utilizando anticuerpos específicos para cerdo. En general es una técnica que se utiliza para detectar proteínas específicas y consiste en separar las proteínas de la muestra en un gel (por peso molecular, hidrofobicidad, estructura, etc.), transferirlas a una membrana para buscar la proteína en estudio con anticuerpos específicos para ella, conjugados a una enzima que cataliza una reacción quimioluminescente, posteriormente se calculan las cantidades relativas respecto a otras proteínas.

En un primer paso, las muestras se homogeneizaron en tampón de lisis (100mmol/L NaCl, 10mmol/L TRIS-Cl (pH 7,6) 1mmol/L EDTA (pH 8), 1mg/ml aprotinina, 100mg/ml PMSF). Todas las muestras se diluyeron (1:1) con tampón 2X (100mmol/L TRIS-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 20% glicerol, 0,1 azul de bromofenol, 200mmol/L ditiotreitól) y se hirvieron 10 minutos a 100°C. Para corregir posibles

variaciones en el tamaño de las muestras se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Cantidades equivalentes de proteína se sometieron a electroforesis en gel de SDS poliacrilamida (10%). Una vez separadas las proteínas, eran transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) a la que quedan unidas irreversiblemente y donde son más accesibles a los anticuerpos específicos de IL-1, TNF- α , BAX, BAD y BCL-2. A continuación las membranas se incubaron 90 minutos a 37°C en un buffer (20mmol/L TRIS, 150 mmol/L NaCl, 0,2% Noninet P 40, 5% leche desnatada) para bloquear la unión inespecífica, y después se incubaron 60 minutos a 20°C en presencia de anticuerpos primarios específicos. Tras un lavado para eliminar el anticuerpo no unido, las membranas se incubaron de nuevo durante 60 minutos a 20°C en presencia de un anticuerpo secundario que reconoce inmunoglobulinas de conejo, acoplado covalentemente a una peroxidasa (horseradish peroxidase-conjugated polyclonal anti-rabbit IgG secondary antibody, Transduction Lab, Lexington, KY). Tras el lavado de las membranas las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia (ECL system, Amersham, Oakville, Ontario).

- Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR):

La PCR es una técnica que aumenta el número de copias de un fragmento de DNA partiendo de un mínimo y de esta forma aumentar la probabilidad de identificarlo. La RT-PCR primero sintetiza DNA a partir de RNA y luego amplifica el número de copias. Con la RT-PCR se calcula el contenido de mRNA específico de una muestra que es el precursor de la proteína que deseamos evaluar.

El aislamiento de ARN del pulmón se realizó utilizando el kit comercial Tri ReagentTM (Sigma-Aldrich, Inc), basado en el método de Chomczynski y Sacchi [227].

La integridad del RNA se determinó mediante un gel de electroforesis de agarosa al 1.5% y la concentración se determinó por espectrofotometría.

Para la transcripción reversa se utilizaron 2µg del ARNm de cada una de las muestras. El proceso se llevó a cabo utilizando un kit comercial (Promega, Madison, WI, USA) de acuerdo a las instrucciones detalladas en el manual y una mezcla de random primers pd(N)6. Para ello se usó 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) y los primers se utilizaron a una concentración de 300nM. La secuencia de primers se muestra en la tabla 2. Se utilizó el gen endógeno 18S como control interno. Los cambios en la expresión del mRNA se analizaron siguiendo el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ [228]. El cADN obtenido se conservó a -20 °C hasta su utilización.

PRIMERS	FORWARD	REVERSE
IL-1	TGTGATGAAAGACGGCACAC	CTCCTTCTTTGGGTATTGTTTGG
TNF-α	ATGAGAAGTTCCCAAATGGC	CTCCACTGGTGGTTTGCTA

Tabla 2. Primers utilizados en la RT-PCR

- Expresión de microRNAs:

El microRNA fue aislado en las muestras de tejido pulmonar usando el Kit de Aislamiento mirVana para miRNA (Ambion Life Technologies, Texas, USA), siguiendo el procedimiento de enriquecimiento para RNAs de pequeño tamaño de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La pureza del RNA y su concentración fueron medidas por espectrofotometría usando Biodrop µL (Isogen Life Science, De Meern, Holanda) a 260/280 nm (ratio > 2.0). Así mismo, se utilizó un gel de electrophoresis de acrilamida al 40% para verificar la pureza siguiendo las recomendaciones del Kit de

Aislamiento mirVana miRNA. De acuerdo a las instrucciones del fabricante, la transcripción inversa de 350-1000 ng de microRNA fue realizada utilizando el Kit de Transcripción Inversa de MicroRNA Taqman® (Custom Reverse Transcription Pools) con el test de microRNA de Taqman® (Ambion Life Technologies, Texas, USA). RT-PCR fue realizada utilizando el sistema Applied Biosystems 7300 con Taqman® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Warrington, UK) y 1µL del correspondiente test MicroRNA 20X. Para la normalización del DNA complementario (cDNA) utilizado en la PCR, fue realizada la amplificación del miR 103 para cada muestra [229]. Los cambios relativos en la expresión genética fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ [228].

ESTADÍSTICA

Los cuatro grupos del estudio (CON, SEVO, SHAM-A, SHAM-B) fueron comparados de acuerdo a los parámetros hemodinámicos, gasometrías arteriales y análisis de las muestras recogidas de tejido pulmonar. Cada parámetro fue analizado de forma separada. En las muestras de tejido pulmonar, cada lóbulo fue comparado por separado. Para identificar las diferencias significativas entre los grupos se utilizó el Test de Kruskal-Wallis (la hipótesis nula fue rechazada para un valor de $\alpha=0,05$). Posteriormente para analizar los pares de muestras específicos y encontrar diferencias significativas fue usado el Test de Mann-Whitney. La significación estadística fue establecida con $P \leq 0,05$.

Todos los datos están expresados como Media \pm desviación estándar.

RESULTADOS

- PARAMETROS HEMODINÁMICOS Y GASOMÉTRICOS: (Tablas 3 y 4)

El uso de sevoflurano no se asoció a una diferencia en los valores hemodinámicos entre los distintos grupos de estudio durante el procedimiento quirúrgico inicial, ni a las 24 horas del mismo. En cuanto a los valores gasométricos existe una mejor oxigenación en el grupo Sham-A durante el procedimiento quirúrgico, sin observarse cambios a las 24 horas.

	Grupo	BASAL	OLV +30	OLV +120	TLV +60	24 h
FC (rpm)	SHAM-A	89,0 (24)	87,5 (13)	88,0 (17)	87,8 (10)	95,0 (16)
	SHAM-B	85 (12)	91 (15)	99,6 (9)	101,2 (8)	95,5 (8)
	CON	94,6 (14)	101,4 (18)	90,8 (8)	96,8 (8)	82,8 (16)
	SEVO	78 (3,7)	107 (6,7)	106,1 (10)	106,6 (9)	111,8 (12,6)
PAM (mm de Hg)	SHAM-A	93 (11)	94 (12)	102 (11)	114 (14)	106 (22)
	SHAM-B	108 (6)	96,25 (10)	110 (7,8)	122 (3)	111,5 (3,2)
	CON	92 (27)	100 (22)	97 (10)	124 (17)	104 (10)
	SEVO	69,8 (14)	97,6 (11)	91,6 (9)	99,3 (12)	98,5 (15)
PVC (mm de Hg)	SHAM-A	9,7(3,8)	9,3 (5,2)	10,5 (4,8)	9,2 (5,5)	6,7 (3,4)
	SHAM-B	12 (1,5)	12,8 (1,2)	12,2 (1,15)	12,4 (1,6)	10,25 (1,2)
	CON	8,2 (5,5)	9,6 (4,3)	9,2 (3,8)	8,4 (4,5)	8,8 (4,8)
	SEVO	6,83 (2)	7,3 (1)	8,1 (2)	7,8 (1,7)	6 (1,2)
IC (l/min/m ²)	SHAM-A	2,73 (0,6)	2,79 (0,7)	2,83 (1,2)	3,45 (1,1)	3,02 (1,1)
	SHAM-B	3,118 (0,5)	2,65 (0,3)	2,87 (0,3)	3,49 (0,6)	3,63 (1,1)
	CON	3,47 (0,8)	3,42 (0,7)	3,14 (0,4)	3,74 (1,0)	2,84 (0,9)
	SEVO	2,07 (0,3)	2,86 (0,4)	2,46 (0,5)	2,8 (0,7)	2,4 (0,2)

GEDVI (l/min/m ²)	SHAM-A	497 (156)	497 (156)	519 (187)	580 (136)	429 (149)
	SHAM-B	463,4 (62)	446 (55)	416,8 (44)	438 (88)	433 (147)
	CON	546 (249)	541 (258)	514 (83)	626 (147)	395 (58)
	SEVO	512 (100)	521 (64)	445 (48)	382 (89)	355 (35)
ELWI (ml/Kg)	SHAM-A	8,5 (2,7)	8,5 (2,7)	13,3 (5,5)	14,2 (5,4)	7,5 (1,2)
	SHAM-B	5,8 (1,1)	9,6 (1,9)	6,8 (2,3)	13 (3,7)	11 (3,16)
	CON	17,0 (10,4)	14,0 (8,5)	14,8 (5,4)	18,6 (7,5)	9,3 (4,2)
	SEVO	6,8 (1,2)	12,3 (2)	13 (4,1)	19,1 (5)	7,6 (1,3)
VVS (%)	SHAM-A	19,0 (5,4)	12,3 (1,8)	11,2 (6,6)	18,0 (5,1)	25,7 (9,1)
	SHAM-B	11,8 (2)	6,4 (1,2)	11 (1,5)	14,8 (3,5)	9,25 (0,85)
	CON	18,4 (6,2)	15,2 (7,9)	15,0 (2,7)	14,6 (4,3)	17,8 (7,4)
	SEVO	14,3 (1,4)	11,3 (2,2)	8,3 (1,2)	15,8 (4,3)	19 (2,9)
RVSI (dyn/s/cm ⁵ /m ²)	SHAM-A	2897 (939)	2680 (733)	3126 (1383)	3067 (1604)	2948 (1050)
	SHAM-B	2128 (383)	2454 (485)	3477 (1112)	2363 (210)	1809 (129)
	CON	1899 (496)	2139 (655)	2349 (405)	2739 (664)	2798 (1185)
	SEVO	3115 (517)	2693 (819)	2692 (647)	3791 (1038)	2993 (744)

Tabla 3.- Valores hemodinámicos: Datos expresados como media (desviación estándar). BAS: Basal, OLV: Ventilación unipulmonar; TLV: Ventilación bipulmonar. CON: Control. SEVO: Sevoflurano. FC: Frecuencia cardíaca; PAM: Presión arterial media; PVC: Presión venosa central; IC: Índice cardíaco; GEDVI: Global end diastolic volume index (índice volumen global diastólico final); ELWI: Extravascular lung water index (índice de agua extravascular pulmonar); VVS: Variabilidad del volumen sistólico; IRVS: Índice de resistencia vasculares sistémicas.

	GRUPO	BASAL	OLV+30	OLV+120	TLV+60	24 H
SaO2 (%)	SHAM-A	99,5 (1,2)	100 (0,0)	100 (0,0)	100 (0,0)	100 (0,0)
	SHAM-B	100(0)	96,4 (1,7)	92,2 (4,2)	96,4 (2,2)	100 (0)
	CON	100 (0,0)	98,6 (1,1)	99,2 (0,9)	99,0 (1,1)	99,8 (0,4)
	SEVO	99,8 (0,1)	96,3(2,9)	99,5 (0,3)	97,8 (0,7)	99,6 (0,3)
ANOVA		NS	NS	NS	NS	NS
PaO2 (mmHg)	SHAM-A	279 (77)	244 (70)	256 (45)	251 (51)	252(54)
	SHAM-B	300 (51)	123 (31)	140 (48)	150,8 (36)	257,5 (19)
	CON	236 (55)	136 (24)	176 (27)	235 (48)	245(59)
	SEVO	233 (24)	137 (28)	223(65)	152 (43)	272,5 (32)
ANOVA		NS	0,008(*,Ω,#)	0,03(*,Ω,#)	NS	NS
PaCO2 (mmHg)	SHAM-A	41,3 (4,2)	40,0 (3,4)	41,3 (4,0)	45,0 (8,7)	39,2 (6,6)
	SHAM-B	49,6 (8)	53 (10)	54,8 (12)	52,4 (3)	49 (3)
	CON	41,4 (5,9)	44,2 (7,8)	43,4 (6,8)	48,0 (9,7)	38,8 (6,9)
	SEVO	45,5 (4)	55 (4)	47,5 (3,2)	52 (3)	41,3 (4)
ANOVA		NS	NS	NS	NS	NS
pH	SHAM-A	7,5 (0,0)	7,5 (0,0)	7,5 (0,0)	7,5 (0,1)	7,5 (0,1)
	SHAM-B	7,41 (0,0)	7,35 (0,0)	7,35 (0,0)	7,35 (0,0)	7,45 (0,0)
	CON	7,5 (0,1)	7,5 (0,1)	7,5 (0,1)	7,4 (0,1)	7,5 (0,1)
	SEVO	7,44 (0,0)	7,38 (0,0)	7,41 (0,0)	7,34 (0,0)	7,47 (0,0)
ANOVA		NS	NS	NS	NS	NS

Tabla 4.- Parámetros respiratorios y gases arteriales: Datos expresados como media (desviación estándar). BAS: Basal, OLV: Ventilación unipulmonar; TLV: Ventilación bipulmonar. CON: Control. SEVO: Sevoflurano; NS: No significativo. (*): CON vs SHAM-A. (#): SEVO vs SHAM-A. (&): SEVO vs CON (Ψ): SEVO vs SHAM-B. (Ω): SHAM-B vs SHAM-A.

BIOPSIAS PULMONARES

- CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS (Tabla 5)

TNF- α WB (Fig.6)

LMD 24h: Se produce un aumento significativo en los grupos Sham-B, Control y Sevo respecto a los valores basales. El grupo Control alcanza valores superiores al resto de grupos. Los grupos Sham-B y Sevo presentan valores superiores respecto a los de Sham-A.

LSI 24h: Se produce un aumento significativo en los grupos Sham-B, Control y Sevo respecto a los valores basales. El grupo Control alcanza valores mayores que el resto de grupos. Los grupos Sham-B y Sevo presentan valores superponibles entre ellos, y significativamente superiores en ambos casos respecto a los de Sham-A.

En los grupos Control y Sevo los valores alcanzados en el LSI 24h son mayores a aquellos en el LMD 24h. No hay diferencias para Sham-A y Sham-B.

TNF-PCR (Fig.7)

LMD 24h: Se produce un aumento significativo en el grupo Control, alcanzando valores mayores que en el resto de grupos. No hay diferencias entre Sham-A, Sham-B y Sevo.

LSI 24h: Se produce un aumento significativo en el grupo Control, alcanzando valores mayores que en el resto de grupos. No hay diferencias entre los valores de Sham-A, Sham-B y Sevo.

No existen diferencias significativas entre los valores alcanzados en ambos pulmones en ningún grupo de estudio.

	GRUPO	LII basal Media (SD)	LMD 24h Media (SD)	LSI 24h Media (SD)
TNF-α PCR (unidades arbitrarias)	SHAM-A	0,1495 (0,04)	0,1173 (0,01)	0,1545 (0,02)
	SHAM-B	0,1386 (0,02)	0,1377 (0,01)	0,1252 (0,02)
	CON	0,1574 (0,00)	0,4052 (0,02)‡	0,4972 (0,01)‡
	SEVO	0,1567 (0,01)	0,1684 (0,03)	0,3011 (0,06)
ANOVA		NS	0,0004(*,Ψ,&)	0,0004(*,Ψ,&)
TNF-α WB (DO/mm ²)	SHAM-A	4,743 (0,47)	5,417 (0,73)	5,354 (0,58)
	SHAM-B	5,311 (0,34)	9,048 (0,21)‡	9,635 (0,14)‡
	CON	4,733 (0,89)	10,580 (0,32)‡	15,826 (1,01)‡†
	SEVO	4,676 (0,56)	7,697 (0,53)‡	9,419 (0,18)‡†
ANOVA		NS	0,000 (*,#,&,&Ω)	0,000 (*,#,Ψ,&,&Ω)
IL-1 PCR (unidades arbitrarias)	SHAM-A	0,102 (0,01)	0,135 (0,03)	0,136 (0,02)
	SHAM-B	0,113 (0,01)	0,116 (0,02)	0,146 (0,00)
	CON	0,121 (0,00)	0,301 (0,02)‡	0,701 (0,09)‡†
	SEVO	0,117 (0,00)	0,192 (0,03)	0,325 (0,01)‡†
ANOVA		NS	0,000 (*,Ψ,&)	0,000 (*,Ψ,#,\$,&)
IL-1 WB (DO/mm ²)	SHAM-A	4,861 (0,91)	4,744 (0,79)	5,358 (0,88)
	SHAM-B	4,072 (0,53)	5,470 (0,70)	7,533 (0,42)‡
	CON	3,745 (0,15)	6,245 (0,65)‡	17,394 (0,70)‡†
	SEVO	4,553 (0,43)	6,805 (0,44)‡	11,272 (0,69)‡†
ANOVA		NS	NS	0,000 (*,Ψ,#,&,&Ω,\$,&)
ICAM-1 (ng/mg proteína)	SHAM-A	45,690 (2,08)	47,164 (1,90)	49,186 (1,57)
	SHAM-B	44,412 (1,56)	51,511 (0,49)‡	52,889 (1,72)‡
	CON	46,932 (0,87)	58,920 (2,26)‡	86,714 (1,99)‡†
	SEVO	45,888 (2,00)	47,412 (0,82)	69,654 (2,87)‡†
ANOVA		NS	0,000 (*,Ψ,&)	0,000 (*,Ψ,#,\$,&)

Tabla 5.- Biopsias pulmonares: LII: Lóbulo inferior izquierdo, LMD: Lóbulo mediastínico derecho, LSI: lóbulo superior izquierdo. (*): CON vs SHAM-A. (&): SEVO vs CON. (#): SEVO vs SHAM-A. (Ψ): CON vs SHAM-B. (\$): SEVO vs SHAM-B (Ω): SHAM-B vs SHAM-A. (‡): p<0.05 vs LII basal. (†) p<0,05 LSI 24h vs LMD 24h.

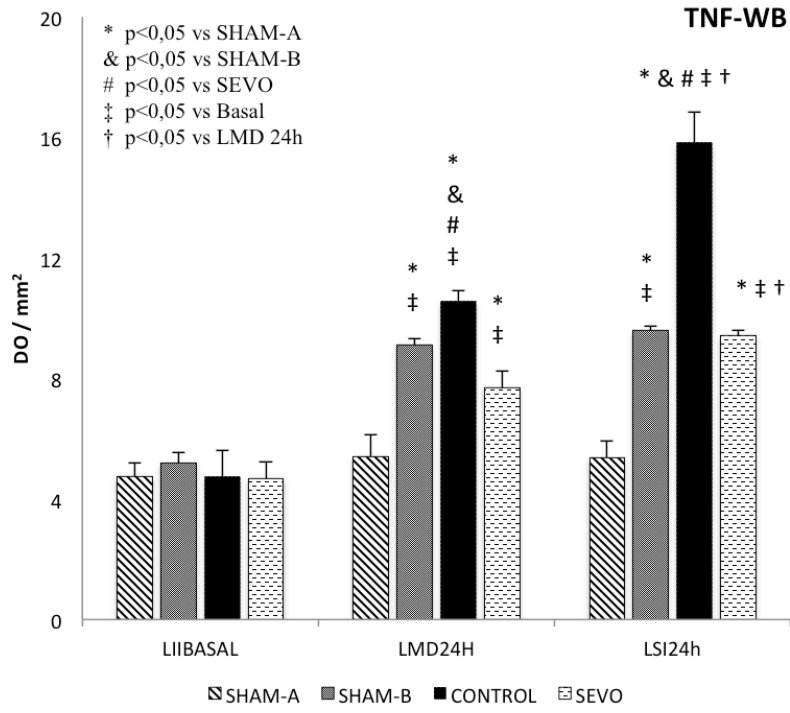


Figura 6

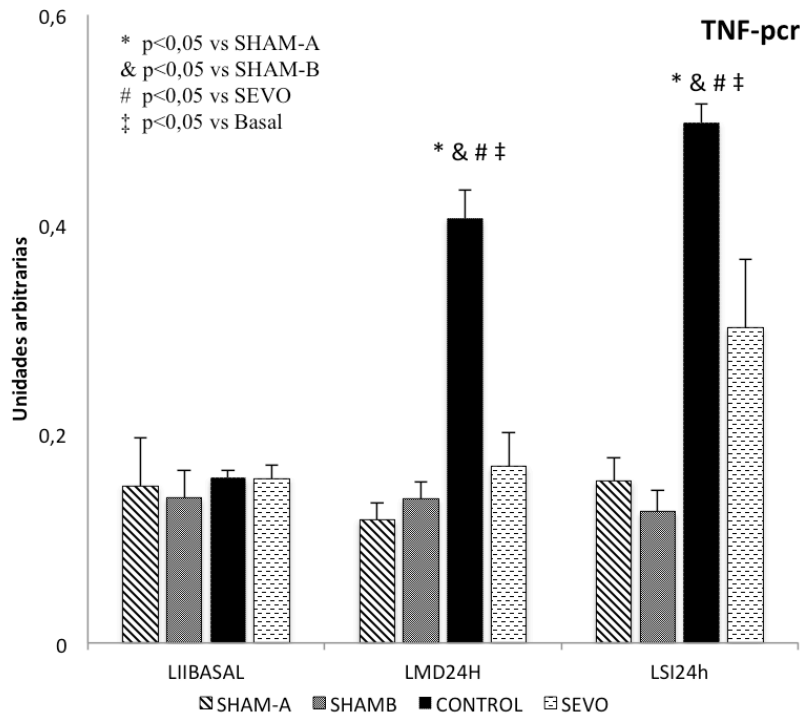


Figura 7

IL-1 PCR (Fig. 8)

LMD 24h: Se produce un aumento en la expresión de IL-1 en el grupo Control, con valores superiores respecto al resto de grupos. No hay diferencias entre los valores de Sham-A, Sham-B y Sevo.

LSI 24h: Se produce un aumento significativo en los grupos Control y Sevo. Los valores en el grupo Control son mayores que en el resto de grupos. Los valores del grupo Sevo son mayores que en Sham-A y Sham-B. No hay diferencias entre Sham-A y Sham-B.

Los valores en los grupos Control y Sevo son mayores en el LSI 24h respecto al LMD 24h. No hay diferencias para Sham-A y Sham-B.

IL-1 WB (Fig. 9)

LMD 24h: Existe un aumento significativo en el grupo Control y en el grupo Sevo respecto a los valores basales. No se observan diferencias entre los grupos de estudio.

LSI 24h: Se produce un aumento significativo en los grupos Sham-B, Control y Sevo. Los valores alcanzados en el grupo Control son mayores respecto al resto de grupos. Los valores del grupo Sevo son mayores que en Sham-A y Sham-B. Los valores de Sham-B son superiores a los de Sham-A.

En los grupos Control y Sevo se alcanzan valores superiores en el LSI 24h respecto al LMD24h. No hay diferencias para Sham-A y Sham-B.

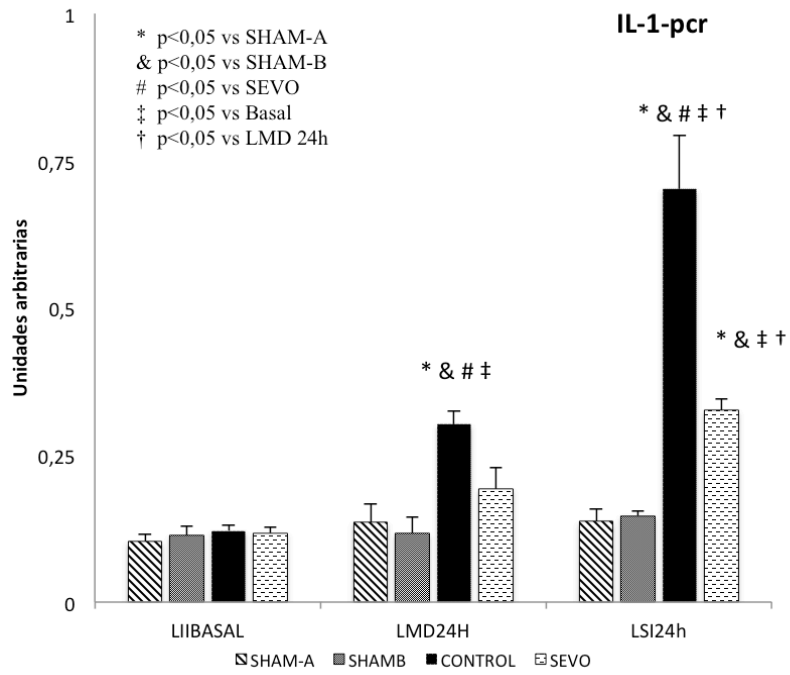


Figura 8

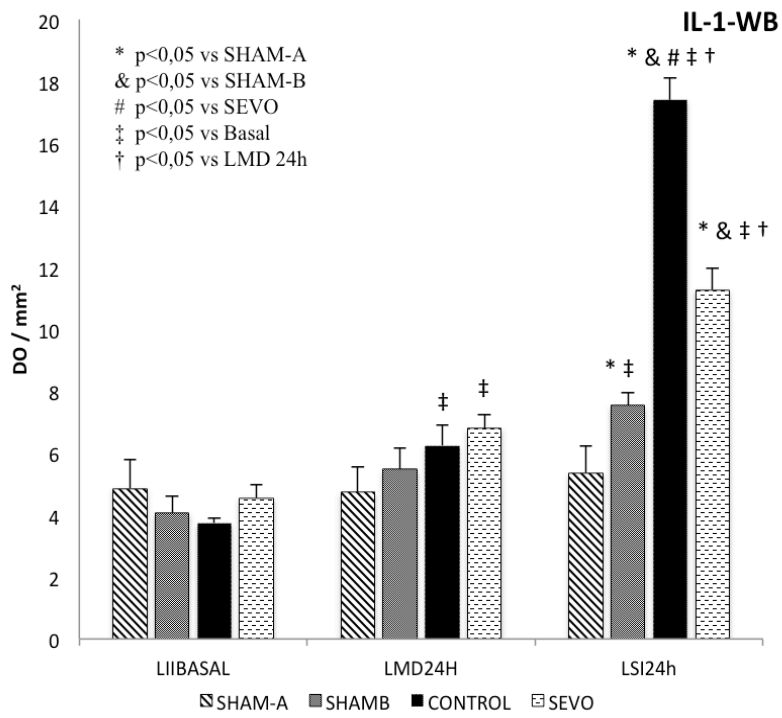


Figura 9

ICAM-1 (Fig. 10)

LMD 24h: Se produce un aumento en los valores de los grupos Sham-B y Control respecto al basal. Los valores del grupo Control son mayores que en el resto de grupos. No existen diferencias entre los valores del resto de grupos.

LSI 24h: Se produce un aumento en los valores de Sham-B, Control y Sevo. Los valores del grupo Control son mayores que en el resto de grupos. Los valores del grupo Sevo son mayores que en Sham-A y Sham-B. No hay diferencias entre los valores de Sham-A y Sham-B.

Los valores del grupo Sevo son mayores en el LSI 24h que en el LMD 24h. No hay diferencias para el resto de grupos.

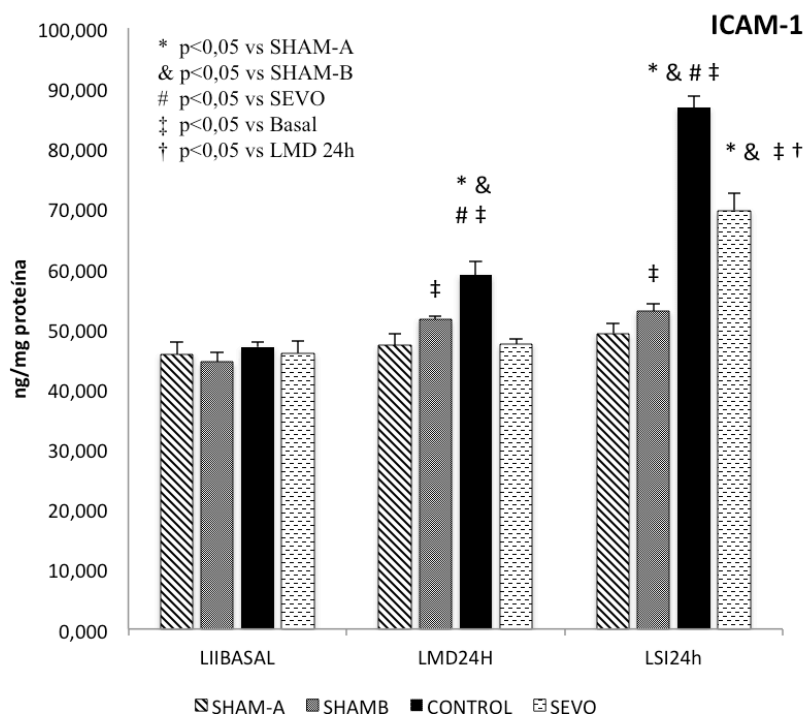


Figura 10

- DEGRADACIÓN GLICOCÁLIX (Tabla 6)

Syndecan-1 (Fig. 11)

LMD 24h: Existe un descenso para los valores de Syndecan-1 en el grupo Control. Los valores del grupo Control son menores respecto al resto de grupos. No existen diferencias entre Sham-A, Sham-B y Sevo.

LSI 24h: Existe un descenso en los grupos Control y Sevo respecto al basal. Los valores del grupo Control son menores respecto al resto de grupos. El grupo Sevo alcanza valores inferiores a Sham-A y Sham-B. No hay diferencias entre Sham-A y Sham-B.

No hay diferencias significativas en ningún grupo de estudio entre los valores en el LMD y el LSI.

SYNDECAN-1 (pg/mg proteína)	SHAM-A	7,036 /0,40)	7,165 (0,72)	7,081 (0,38)
	SHAM-B	7,139 (0,15)	6,855 (0,11)	6,621 (0,22)
	CON	7,271 (0,31)	5,268 (0,41)‡	3,302 (0,20)‡
	SEVO	7,228 (0,36)	6,462 (0,18)	5,189 (0,41)‡
ANOVA		NS	0,000 (*,Ψ,&)	0,000 (*,Ψ,#,\$,&)

Tabla 6.- Biopsias pulmonares: LII: Lóbulo inferior izquierdo, LMD: Lóbulo mediastínico derecho, LSI: lóbulo superior izquierdo. (*): CON vs SHAM-A. (&): SEVO vs CON. (#): SEVO vs SHAM-A. (Ψ): CON vs SHAM-B. (\$) : SEVO vs SHAM-B (Ω): SHAM-B vs SHAM-A. (‡): p<0.05 vs LII basal. (†) p<0,05 LSI 24h vs LMD 24h.

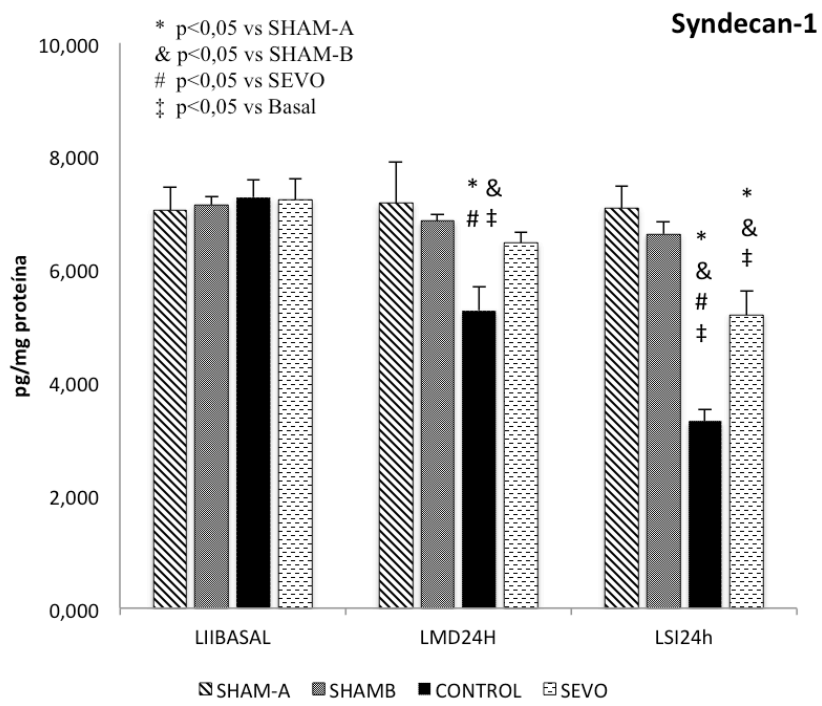


Figura 11

-EDEMA PULMONAR (Tabla 7 y Fig. 12)

LMD24h: Existe un aumento del grado de edema en el grupo Control respecto a los valores basales. Los valores en el grupo Control son mayores que en el resto de grupos. No hay diferencias entre los valores de Sham-A, Sham-B y Sevo.

LSI24h: Existe un aumento del grado de edema en el grupo Control respecto a los valores basales. Los valores en el grupo Control son mayores que en el resto de grupos. No hay diferencias entre los valores de Sham-A, Sham-B y Sevo.

No existen diferencias entre los resultados de ambos lóbulos pulmonares para cualquiera de los grupos de estudio.

	GRUPO	LII basal Media (SD)	LMD 24h Media (SD)	LSI 24h Media (SD)
EDEMA (Relación peso seco /peso húmedo)	SHAM-A	68,870 (3,54)	69,447 (3,09)	69,188 (3,87)
	SHAM-B	69,221 (0,33)	71,516 (0,98)	71,779 (1,08)
	CON	70,136 (0,71)	87,419 (0,682)‡	84,400 (0,21)‡
	SEVO	65,640 (3,33)	69,851 (2,93)	69,150 (2,83)
ANOVA		NS	0,000 (*,Ψ,&)	0,000 (*,Ψ,&)

Tabla 7.- Biopsias pulmonares: LII: Lóbulo inferior izquierdo, LMD: Lóbulo mediastínico derecho, LSI: lóbulo superior izquierdo. (*): CON vs SHAM-A. (&): SEVO vs CON. (Ψ): CON vs SHAM-B. (‡): p<0.05 vs LII basal.

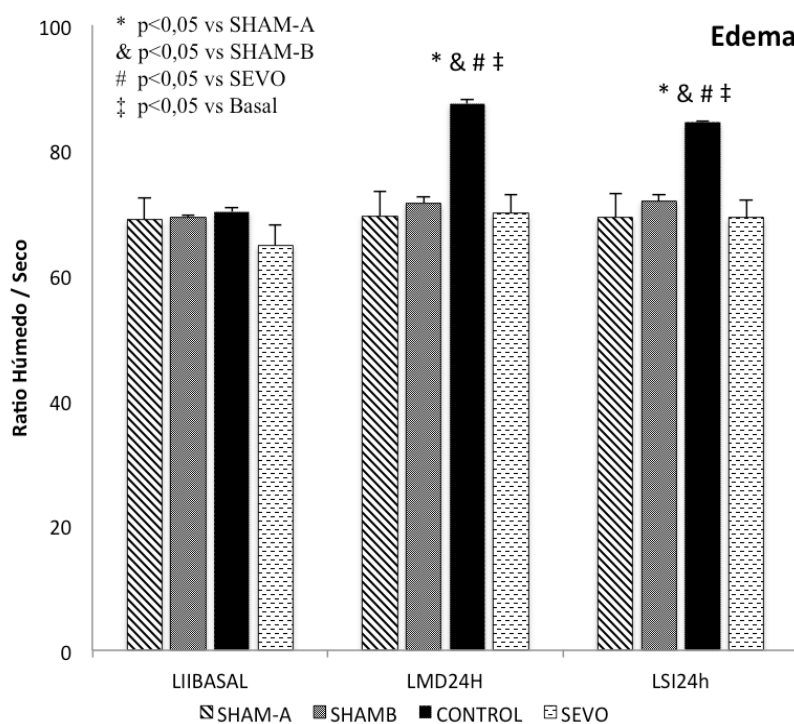


Figura 12

-APOPTOSIS (Tabla 8)

BAX (Fig. 13)

LMD 24h: Se produce un aumento para los valores del grupo control. Los valores del grupo Control son mayores que los de Sham-A, sin que existan diferencias respecto a Sham-B y Sevo. No hay diferencias entre Sham-A, Sham-B y Sevo.

LSI 24h:Se produce un aumento para los valores del grupo Control y el grupo Sevo. Los valores del grupo Control con mayores que los del resto de grupos. Los valores de Sevo son mayores que Sham-A, sin que existan diferencias respecto a Sham-B. No hay diferencias entre los valores de Sham-A y Sham-B

Los valores del grupo control en el LSI son mayores respecto al LMD. No existen diferencias para el resto de grupos.

BAD (Fig. 14)

LMD 24h: Existe un aumento en los grupos Sham-B y Control. Los valores de los grupos Sham-B y Control son mayores que los de los grupos Sham-A y Sevo. No hay diferencia entre Sham-B y Control. Tampoco hay diferencia entre Sham-A y Sevo.

LSI 24h: Existe un aumento en los valores de los grupo Sham-B, Control y Sevo. Los valores del grupo Control son mayores respecto al resto de grupos. Los valores del grupo Sevo son mayores que Sham-A y Sham-B. Los valores de Sham-B son mayores que Sham-A.

Respecto al grupo Sevo, existe diferencias significativas con unos niveles mayores en el LSI respecto al LMD. Sin que existan diferencias para el resto de grupos.

	GRUPO	LII basal Media (SD)	LMD 24h Media (SD)	LSI 24h Media (SD)
CASPASA -3 WB (DO/mm ²)	SHAM-A	7,125 (0,46)	6,910 (0,41)	7,088 (0,23)
	SHAM-B	7,428 (0,53)	6,828 (0,44)	7,129 (0,53)
	CON	6,805 (0,18)	8,158 (0,23)‡	11,721 (0,43)‡†
	SEVO	7,157 (0,48)	7,444 (0,41)	7,224 (0,19)
ANOVA		NS	0,000 (*,Ψ)	0,000 (*,Ψ,&)
BAX WB (DO/mm ²)	SHAM-A	6,656 (0,31)	6,770 (0,28)	7,239 (0,44)
	SHAM-B	6,692 (0,48)	7,456 (0,49)	7,700 (0,09)
	CON	6,153 (0,65)	8,404 (0,28)‡	12,200 (1,15)‡†
	SEVO	6,807 (0,51)	7,431 (0,49)	8,872 (0,12)‡
ANOVA		NS	0,000 (*)	0,000 (*,Ψ,#,&)
BAD WB (DO/mm ²)	SHAM-A	5,966 (0,34)	6,439 (0,12)	5,540 (0,54)
	SHAM-B	5,813 (0,65)	8,681 (0,42)‡	7,775 (0,59)‡
	CON	5,673 (0,24)	8,588 (0,15)‡	13,425 (0,63)‡
	SEVO	5,782 (0,50)	6,032 (0,35)	9,198 (0,32)‡†
ANOVA		NS	0,000 (Ω,*,\$,&)	0,000 (Ω,*,#,Ψ,\$,&)
BCL2 WB (DO/mm ²)	SHAM-A	7,438 (0,43)	7,471 (0,87)	7,455 (0,75)
	SHAM-B	7,268 (0,53)	7,119 (0,82)	7,735 (1,02)
	CON	8,610 (0,23)	6,614 (0,45)‡	5,785 (0,35)‡
	SEVO	8,665 (0,15)	9,219 (1,34)	5,361 (0,37)‡†
ANOVA		NS	0,008 (\$,&)	0,008 (#,\$,Ψ)

Tabla 8- Biopsias pulmonares: LII: Lóbulo inferior izquierdo, LMD: Lóbulo mediastínico derecho, LSI: lóbulo superior izquierdo. (*): CON vs SHAM-A. (&): SEVO vs CON. (#): SEVO vs SHAM-A. (Ψ): CON vs SHAM-B. (\$): SEVO vs SHAM-B (Ω): SHAM-B vs SHAM-A. (‡): p<0.05 vs LII basal. (†) p<0,05 LSI 24h vs LMD 24h.

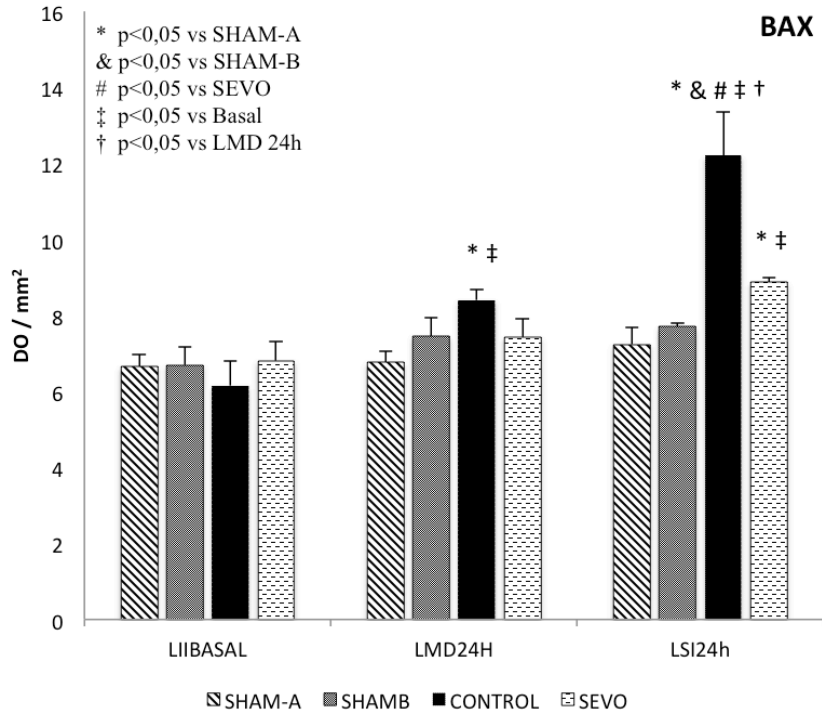


Figura 13

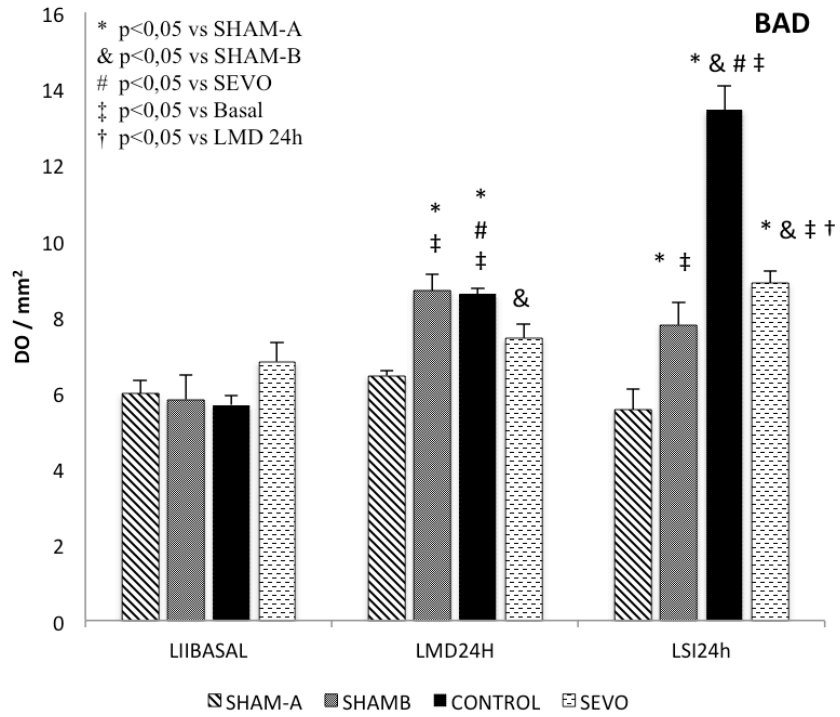


Figura 14

Caspasa-3 (Fig. 15)

LMD 24h: Se produce un aumento en el grupo Control respecto a los valores basales. Los valores del grupo Control son mayores que en Sham-A y Sham-B, sin que existan diferencias respecto a los del grupo Sevo. No hay diferencias entre los valores de Sham-A, Sham-B y Sevo.

LSI 24h: Se produce un aumento en el grupo control respecto a los valores basales. Los valores del grupo Control son mayores respecto al resto de grupos. No existen diferencias entre los valores de Sham-A, Sham-B y Sevo.

Los valores del grupo Control son mayores en el LSI que en el LMD. No existen diferencias para el resto de grupos.

BCL-2 (Fig. 16)

LMD 24h: Se produce un descenso en el grupo Control respecto a los valores basales. Los valores del grupo Control y del grupo Sham-B son significativamente menores que los del grupo Sevo. No hay diferencias entre el grupo Control y Sham-B. No hay diferencias en los valores de Sham-A respecto al resto de grupos.

LSI 24h: Existe un descenso en los valores de los grupos Control y Sevo respecto a los basales. No hay diferencias entre los grupos Control y Sevo. Estos dos grupos tienen valores menores a Sham-B. No hay diferencias en los valores de Sham-A respecto al resto de grupos.

Los valores del grupo Sevo son menores en el LSI que en el LMD. No hay diferencias para el resto de grupos.

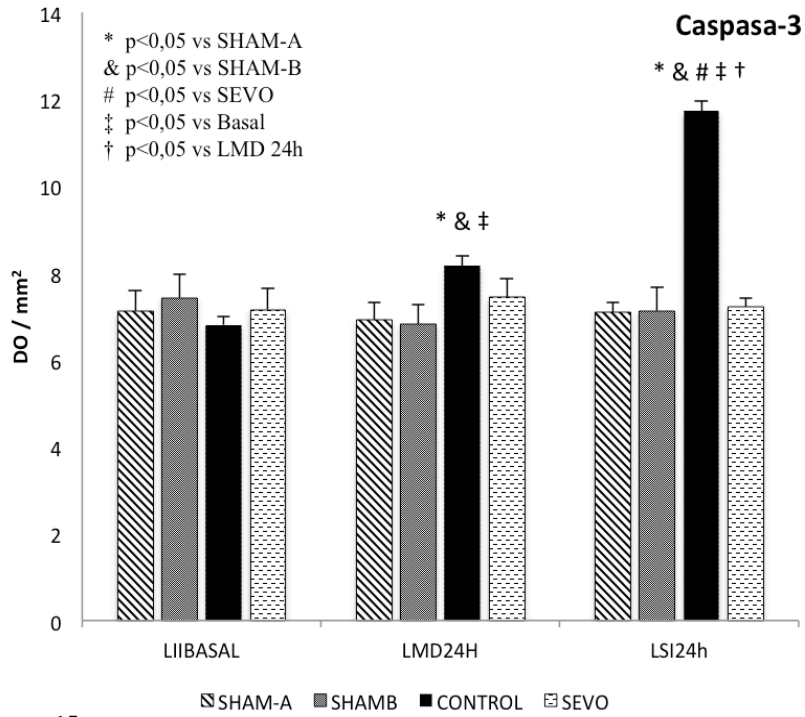


Figura 15

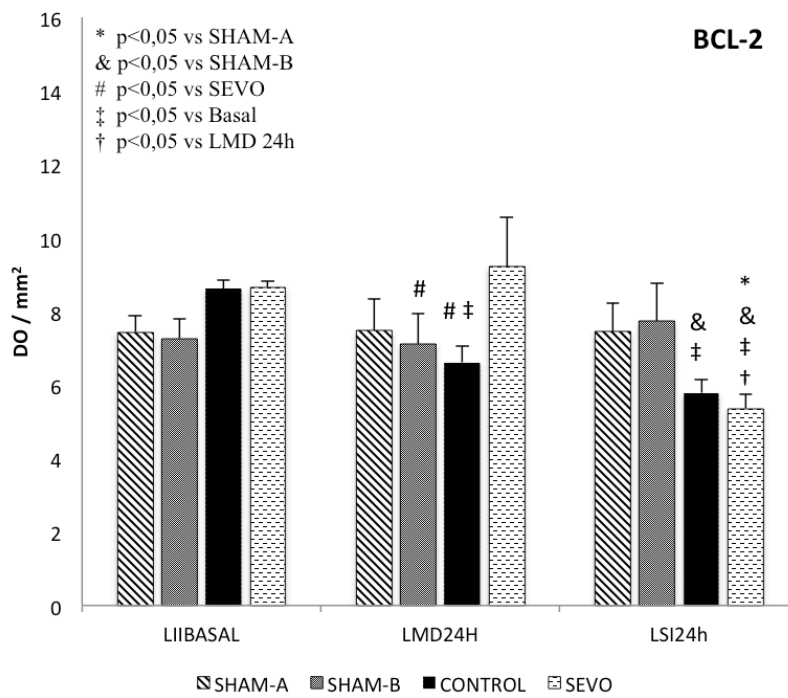


Figura 16

- EXPRESIÓN DE MICRORNAS (Tabla 9)

En varios MicroRNAs (miRNA146, miRNA 107, miRNAlet7d, miRNA192) no se observan cambios estadísticamente significativos entre los distintos grupos de estudio, ni un cambio con la evolución temporal, así como tampoco variaciones entre uno y otro lóbulo pulmonar (Fig. 19-22). Sin embargo si parece existir una disminución no significativa de los niveles del miRNAlet7d en el grupo Control a las 24 horas (Fig.21).

Mi RNA 145 (Fig. 17)

LSI 24h: No existen diferencias respecto a los valores basales en ningún grupo. Tampoco existen diferencias entre los distintos grupos de estudio.

LMD 24h: Existe un aumento en los grupos Control y Sevo respecto a los valores basales. Los valores del grupo Control son mayores que los de Sham-A sin que existan diferencias respecto a Sham-B y Sevo. No existen diferencias entre Sham-A, Sham-B y Sevo.

No hay diferencias significativas en ningún grupo de estudio entre los valores en el LMD y el LSI.

Mi RNA 182 (Fig. 18)

LSI 24h: Existe un aumento en el grupo Control respecto a los valores basales. Los valores del grupo Control son mayores respecto al resto de grupos. No hay diferencias entre Sham-A, Sham-B y Sevo

LMD 24h: Existe un aumento en el grupo Control respecto a los valores basales.

Los valores del grupo Control son mayores respecto al resto de grupos. No hay diferencias entre Sham-A, Sham-B y Sevo.

Los valores del grupo control son mayores en el LSI que en el LMD. No hay diferencias para el resto de grupos.

	GRUPO	LII basal Media (SD)	LMD 24h Media (SD)	LSI 24h Media (SD)
mRNA-107 (Unidades arbitrarias)	SHAM-A	0,890 (0,18)	0,862 (0,06)	1,008 (0,05)
	SHAM-B	1,031 (0,23)	0,792 (0,06)	1,017 (0,09)
	CON	1,047 (0,18)	0,714 (0,10)	0,985 (0,09)
	SEVO	1,007 (0,17)	1,116 (0,21)	1,390 (0,15)
ANOVA		NS	NS	NS
mRNA-let7d (Unidades arbitrarias)	SHAM-A	1,457 (0,57)	1,475 (0,57)	1,500 (0,14)
	SHAM-B	1,430 (0,16)	1,264 (0,22)	1,388 (0,10)
	CON	1,453 (0,07)	0,483 (0,08)	0,618 (0,10)
	SEVO	1,551 (0,05)	1,195 (0,10)	1,384 (0,17)
ANOVA		NS	NS	NS
mRNA-145 (Unidades arbitrarias)	SHAM-A	1,373 (0,09)	1,268 (0,18)	1,453 (0,14)
	SHAM-B	1,386 (0,16)	1,432 (0,03)	1,666 (0,20)
	CON	1,284 (0,04)	1,556 (0,04)	1,914 (0,04)‡
	SEVO	1,371 (0,04)	1,507 (0,15)	1,675 (0,15)‡
ANOVA		NS	NS	0,046 (*)
mRNA-146 (Unidades arbitrarias)	SHAM-A	1,281 (0,11)	1,220 (0,22)	1,187 (0,15)
	SHAM-B	1,282 (0,14)	1,278 (0,10)	1,278 (0,02)
	CON	1,282 (0,16)	1,176 (0,09)	0,837 (0,10)
	SEVO	1,324 (0,16)	1,369 (0,18)	1,322 (0,04)
ANOVA		NS	NS	NS
mRNA-182 (Unidades arbitrarias)	SHAM-A	1,393 (0,11)	1,347 (0,02)	1,382 (0,05)
	SHAM-B	1,340 (0,03)	1,430 (0,04)	1,419 (0,07)
	CON	1,352 (0,02)	1,712 (0,04)‡	1,941 (0,03)‡†
	SEVO	1,332 (0,04)	1,315 (0,04)	1,394 (0,03)
ANOVA		NS	0,000 (*,Ψ,&)	0,000 (*,Ψ,&)
mRNA-192 (Unidades arbitrarias)	SHAM-A	1,077 (0,09)	1,004 (0,13)	1,046 (0,05)
	SHAM-B	1,098 (0,23)	1,158 (0,09)	1,168 (0,11)
	CON	1,082 (0,02)	1,206 (0,05)	1,360 (0,03)
	SEVO	1,077 (0,09)	1,066 (0,11)	1,079 (0,05)
ANOVA		NS	NS	NS

Tabla 9: MicroRNAs: LII: Lóbulo inferior izquierdo, LMD: Lóbulo mediastínico derecho, LSI: lóbulo superior izquierdo. (*): CON vs SHAM-A. (&): SEVO vs CON. (#): SEVO vs SHAM-A. (Ψ): CON vs SHAM-B. (\$): SEVO vs SHAM-B (Ω): SHAM-B vs SHAM-A. (‡): p<0.05 vs LII basal. (†) p<0,05 LSI 24h vs LMD 24h.

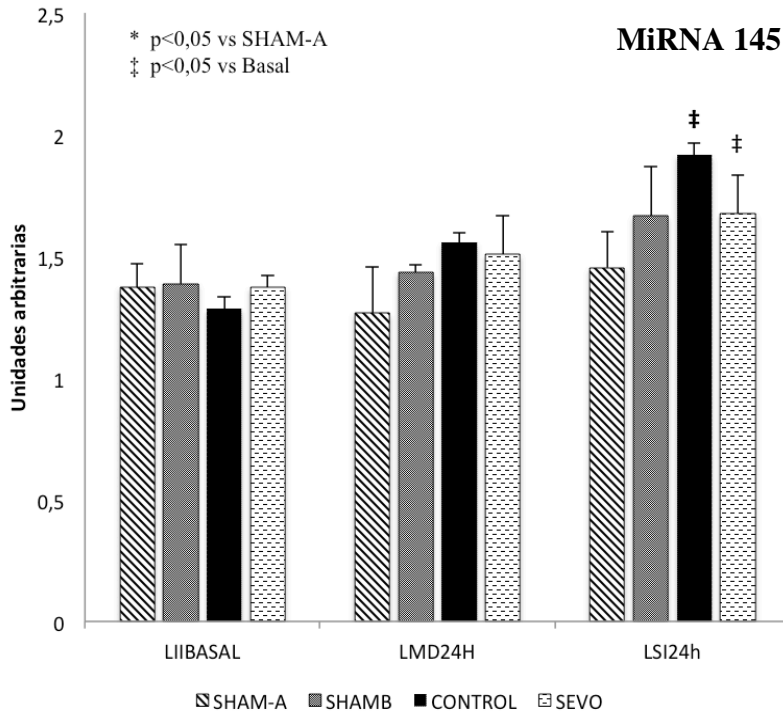


Figura 17

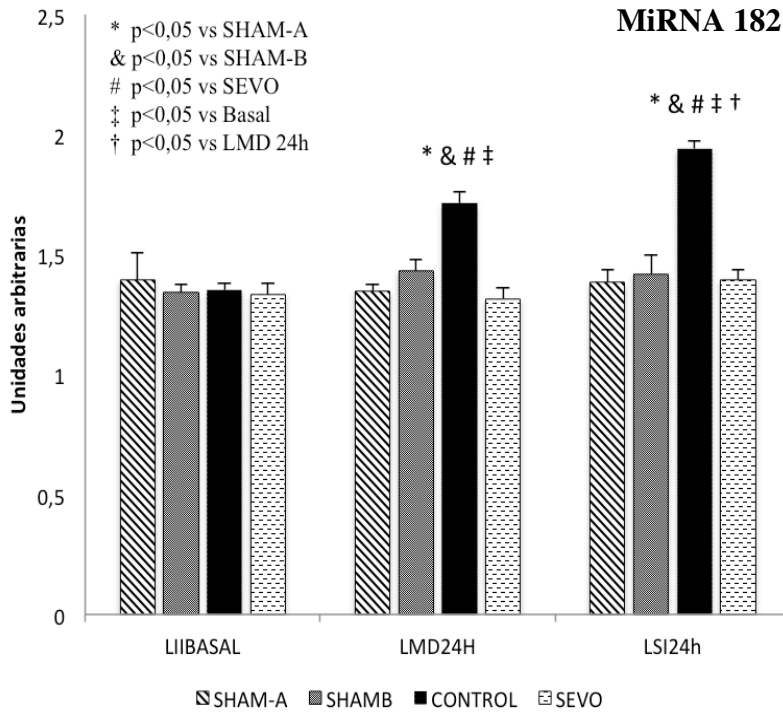


Figura 18

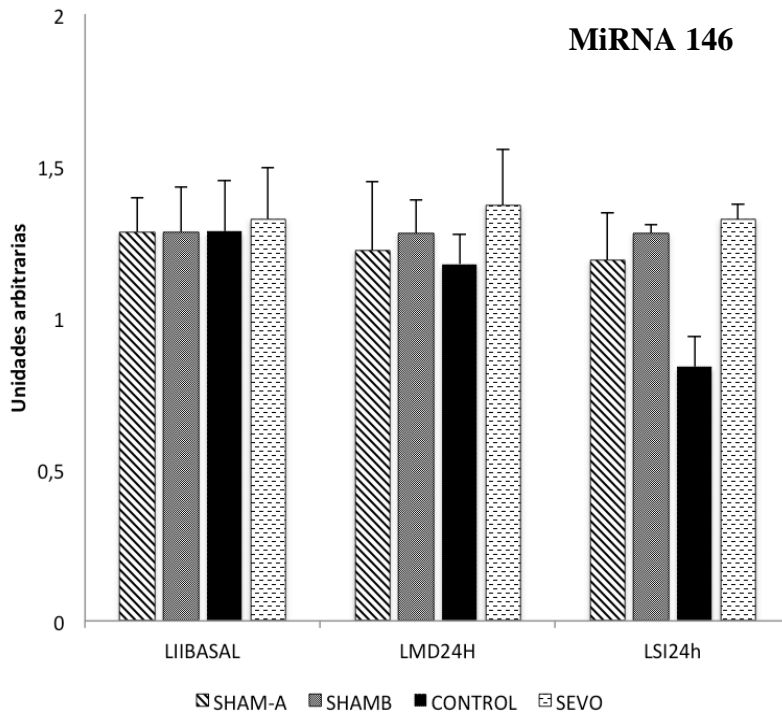


Figura 19

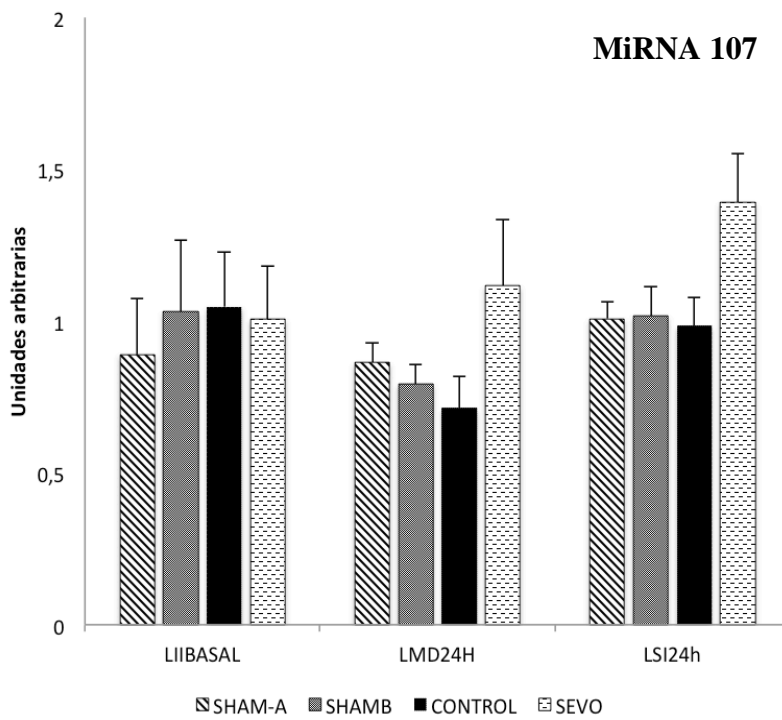


Figura 20

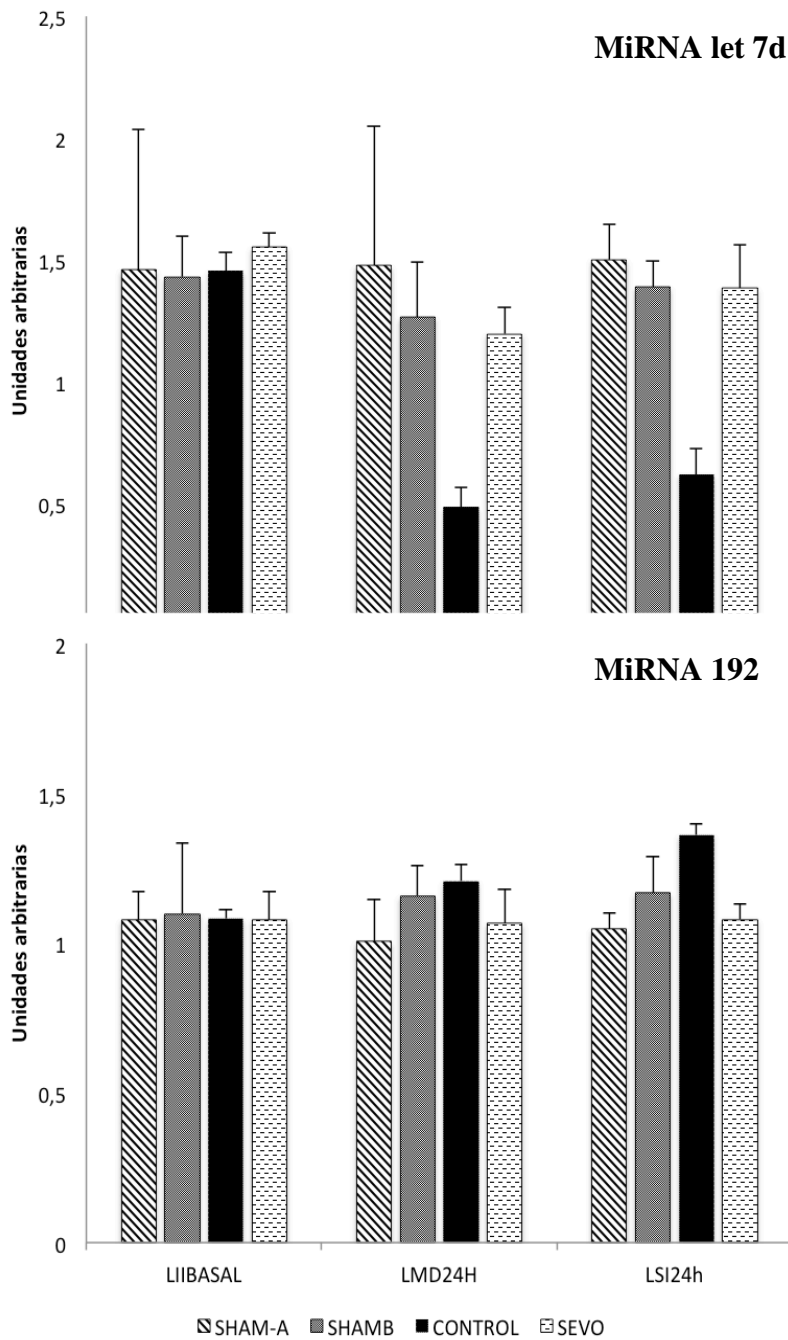


Figura 22

DISCUSIÓN

1) RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA CIRUGIA DE RESECCIÓN PULMONAR

A la luz de los resultados objetivados en el grupo Control, en este modelo experimental de cirugía de resección pulmonar se puede observar como existe un aumento en la producción local de mediadores inflamatorios y proapoptóticos a las 24 horas del procedimiento quirúrgico. Este aumento se asocia a la presencia de edema pulmonar, lo cual refleja el daño pulmonar que se produce como consecuencia. Estos datos son concordantes con los estudios previos que ya habían descrito una respuesta inflamatoria similar [41]. En este caso, podemos observar como los efectos condicionados por la CRP con OLV de dos horas de duración persisten a las 24 horas del procedimiento, al contrario de otras investigaciones que han objetivado una normalización a las 24 horas [226]. Al recoger muestras pulmonares, y no sistémicas, vemos reflejado con mayor precisión cual es la reacción inflamatoria local producida. Así, hemos podido observar que la respuesta inflamatoria y apoptótica asociada a la CRP se produce a nivel bilateral, pero de forma asimétrica.

Respecto a los principales parámetros inflamatorios estudiados, la CRP con OLV induce un aumento de la expresión de TNF- α e IL-1 (Fig. 6-9), que se produce de forma más relevante a nivel del pulmón izquierdo que ha sido sometido al procedimiento quirúrgico. A nivel de las membranas celulares, la expresión de ICAM-1 en pulmón también aumenta (Fig. 10). Esto concuerda con que uno de los principales estímulos para la expresión de ICAM-1 en las membranas de las células endoteliales y epiteliales sea la estimulación por parte de TNF- α e IL-1, lo que provoca que observemos un patrón de expresión similar en estas proteínas.

Los niveles de Syndecan-1, que reflejan la integridad del glicocáliz epitelial y endotelial, se reducen como consecuencia de la CRP (Fig. 11), también con una afectación en mayor grado en el pulmón no dependiente. Esto parece coincidir con los

estudios que abogan por un papel protector de esta glicoproteína en los fenómenos inflamatorios, al localizar el proceso y no permitiendo la extravasación de los neutrófilos hacia los espacios alveolares [114]. Así mismo, en algunos estudios con ratones Knock-out para Syndecan-1 se produce una mayor inflamación y migración neutrofílica ante estímulos nocivos, probablemente como resultado de la pérdida del papel regulador de esta glicoproteína en la hidrodinámica endotelial [106]. Las funciones pro inflamatorias o antiinflamatorias de Syndecan-1 parecen depender de su patrón espacial y temporal en la expresión [114, 230]. En este caso, observamos claramente un efecto protector asociado a la presencia de mayores niveles aislados en las muestras pulmonares. Este hecho probablemente traduzca la degradación del glicocáliz endotelial como consecuencia de la reacción inflamatoria, con descenso en la expresión de Syndecan-1 en la membrana, pero con un probable aumento si midiéramos los niveles en suero.

La relación de la apoptosis con los procesos de daño pulmonar agudo es bien conocida [137, 139, 140]. Su activación se puede producir como consecuencia de los fenómenos inflamatorios (vía extrínseca)[132], el estrés oxidativo [133], una activación directa como consecuencia de la ventilación mecánica (vía intrínseca) [134], así como con el estrés quirúrgico [135]. Esto condiciona tanto la supervivencia de los neutrófilos a nivel del foco inflamatorio pulmonar [68], como la destrucción del epitelio con la consiguiente alteración en la permeabilidad y edema pulmonar [144].

En este estudio se observa una activación de los procesos apoptóticos en ambos pulmones, con aumento de la expresión de BAX, BAD y caspasa-3 (Fig. 13-15), asociando una disminución en la expresión de Bcl-2 (antiapoptótica) (Fig.16). Esta activación de la apoptosis se produce de forma más acusada en el pulmón no ventilado durante la resección pulmonar, resultado concordante con los datos respecto a los

parámetros inflamatorios. Como vemos, el grado de expresión de la caspasa 3 es mucho mayor en el pulmón sometido a la cirugía. Este hecho puede justificarse por la mayor actividad de BAX y BAD y menor de Bcl-2, así como por la mayor expresión de TNF- α e IL-1 [149] que detectamos en este pulmón, siendo en este caso la apoptosis también un reflejo de la mayor actividad pro inflamatoria.

El grado de edema pulmonar observado como consecuencia de la CRP se produce con igual severidad en ambos pulmones (Fig. 12), a pesar de que la activación inflamatoria y apoptótica sea mayor en el pulmón sometido al procedimiento quirúrgico. Este mayor edema pulmonar podría estar también condicionado por la pérdida de Syndecan-1 a nivel del glicocáliz, lo que condicionaría una alteración en la normal permeabilidad endotelial al perder el fundamental papel regulador de esta glicoproteína.

Respecto a los distintos microRNAs estudiados se observa únicamente diferencias en la expresión del miRNA-182 y miRNA-145 (Fig. 17 y 18), produciéndose un aumento en la expresión de ambos durante la CRP. En el caso del miRNA-182 se produce este aumento en ambos pulmones (en el miRNA-145 sólo en el pulmón no ventilado) que es contrarrestado con la administración de sevoflurano. El papel concreto de un miRNA parece difícil de determinar, debido a los múltiples mRNA sustrato potenciales para cada uno de ellos. En este caso parece que ligado a la activación de los procesos inflamatorios y apoptóticos objetivamos un aumento del miRNA-182 y el miRNA-145. Si bien es difícil determinar el significado específico de estos resultados, podría responder a un rol de los microRNAs en la modulación de los procesos inflamatorios observados. En coherencia con los resultados observados en el resto de parámetros, los niveles del miRNA-182 son mayores en el pulmón sometido al procedimiento quirúrgico.

El efecto pro apoptótico del miRNA-145 ya había sido descrito previamente en relación a fenómenos de isquemia-reperfusión en el tejido cerebral [170] y en relación a la apoptosis de células tumorales [231]. Por lo tanto, es probable que desempeñe un papel similar a nivel pulmonar. Respecto al miRNA-182, su relación con fenómenos inflamatorios ha sido observada al provocar una activación del NF-KB [232], factor de transcripción nuclear implicado en procesos inflamatorios y reparadores tras lesiones tisulares, así como a un aumento de la proliferación celular en algunos tumores [233]. Nos parece pronto para atribuir específicamente un papel concreto de los miRNA en la lesión pulmonar asociada a la CRP. Una mejor comprensión del objetivo de acción de cada miRNA, y de como interactúan entre ellos para balancear la respuesta inflamatoria, parece necesario para clarificar el rol específico de cada uno de ellos. Su relación y posible papel regulador respecto a los fenómenos inflamatorios y apoptóticos podría convertirlos en potenciales dianas terapéuticas en un futuro próximo.

Curiosamente la cirugía de resección pulmonar, a pesar del aumento del edema pulmonar, no ha condicionado a las 24 horas del procedimiento los cambios en la oxigenación ni en la hemodinámica que pudieran esperarse. Creemos que es probable que con un periodo de estudio más prolongado, los cambios moleculares y el grado de edema pulmonar observados, tuvieran un correlato gasométrico objetivable.

Respecto al grupo SHAM-A (no sometido a CRP ni a OLV) no se observan cambios a las 24 horas en los parámetros inflamatorios inducidos por el procedimiento anestésico, la toracotomía o la ventilación bipulmonar. Es posible que la leve injuria pulmonar que pueda suponer la ventilación bipulmonar de 2 horas de duración, induzca cambios moleculares que ya se hayan normalizado a las 24 horas del procedimiento.

2) INFLUENCIA DE LA VENTILACIÓN UNIPULMONAR

La ventilación unipulmonar amplía el campo quirúrgico durante la CRP, y reduce la potencial contaminación o diseminación hacia el pulmón contralateral. Esto mejora la eficacia y precisión de la cirugía y la seguridad del paciente. Por otro lado, es conocido cómo supone una concatenación de estímulos agresivos para el pulmón [17], y que condiciona en gran medida el desarrollo de DPA.

En nuestro estudio, en el caso de algunos mediadores estudiados (TNF- α , IL-1 y BAD), se observa un aumento en el grupo SHAM-B (no sometido al procedimiento de resección pulmonar, pero sí a la OLV) respecto al grupo SHAM-A. Esto apunta hacia una influencia importante de este procedimiento ventilatorio en la respuesta inflamatoria y daño pulmonar secundario asociado al procedimiento quirúrgico. La elevación de TNF- α (por Western-Blot) y de BAD observada en el grupo SHAM-B se produce de manera simétrica en ambos pulmones, sin que existan diferencias significativas (Fig. 6 y 14), mientras que en el caso de la IL-1-WB sólo vemos una elevación en el pulmón no-dependiente. Esto concuerda con las observaciones acerca de cómo la OLV afecta a la respuesta inflamatoria a nivel bilateral [234]. El pulmón dependiente se afecta por la hiperoxia, la ventilación mecánica, y la hiperperfusión. De forma opuesta el pulmón no-dependiente se afecta debido al colapso pulmonar, la hipoxia, la VPH asociada, el SIR y daño alveolar asociado a la re-expansión pulmonar.

Estos efectos observados en el grupo SHAM-B, se producen debido al efecto aislado de la OLV, y el SIR invariablemente asociado al colapso y re-expansión del pulmón no-dependiente, pero en ningún caso se encuentran en relación a la manipulación quirúrgica. Parece que la OLV puede condicionar un aumento en la secreción de TNF- α e IL-1 en ambos pulmones, desencadenando un proceso

inflamatorio por sí misma, lo cual ya había sido observado en estudios previos[41, 53]. Por otro lado, respecto de la proteína BAD, implicada en la inhibición de Bcl-2, parece existir una activación en el grupo SHAM- B probablemente condicionada por la OLV. A pesar de estas alteraciones, no hemos objetivado que la OLV de forma aislada induzca cambios en relación al grado de edema pulmonar observado.

Parece que la OLV desencadena por sí misma una activación de procesos inflamatorios y apoptóticos. En este caso observamos cómo un periodo de OLV de 2 horas de duración provoca cambios relevantes en la secreción de mediadores inflamatorios y apoptóticos que persisten a las 24 horas en ambos pulmones, lo que eventualmente podría desencadenar una alteración clínicamente relevante. El mecanismo de este aumento en la expresión de ambos mediadores no parece necesariamente interrelacionado. Si bien el TNF- α puede producir una activación de los procesos apoptóticos, esto se produciría a través de vía extrínseca mediada por FADD y caspasa 8, mientras que BAD es una proteína implicada en los procesos iniciales de activación de la vía intrínseca, como consecuencia de una activación intracelular. Esta activación puede ser causada por daño celular, lo que provocaría posteriormente la degradación de la membrana mitocondrial y la activación del citocromo C y la caspasa 9 [127].

Según nuestros resultados, no observamos que la OLV de forma aislada produzca cambios significativos a nivel de las membranas celulares y el glicocáliz (ICAM-1, Syndecan-1), así como tampoco modificación alguna en el patrón de expresión de los microRNAs.

A la luz de los resultados, observamos como la OLV tiene, per sé, una influencia en la activación de los procesos pro inflamatorios y pro apoptóticos en ambos pulmones que es detectable 24 horas después. Esto concuerda con otros resultados

previos que relacionaban la lesión pulmonar por isquemia-reperusión, condicionada por la OLV, con una activación de la inflamación y apoptosis [155]. Estas alteraciones bioquímicas no se han traducido en un mayor grado de edema pulmonar en grupo SHAM-B, es posible con una tamaño muestral mayor o con un periodo de estudio más prolongado sí que se observaran cambios en el grado de edema pulmonar. Sin embargo, parece claro que la OLV es un factor clave que condiciona el grado de daño pulmonar postoperatorio en la CRP. Aquellas técnicas encaminadas a atenuar la agresión que supone esta técnica de ventilación (limitación de presión de ventilación, restricción de fluidos, acortar duración de la OLV...) van a ayudar a atenuar el grado de daño pulmonar postoperatorio de los pacientes sometidos a cirugías torácicas que impliquen este tipo de procedimiento ventilatorio.

3) INFLUENCIA DE LA MANIPULACIÓN QUIRÚRGICA

La manipulación quirúrgica del tejido pulmonar durante el procedimiento puede causar una lesión similar a la contusión pulmonar. Los procedimientos de CRP con OLV se realizan cada vez con más frecuencia mediante abordajes mínimamente invasivos como la VATS, que han demostrado causar una menor respuesta inflamatoria sistémica que los procedimientos realizados mediante cirugía abierta con toracotomía postero-lateral [60, 62]. Hay que llamar la atención sobre el hecho de que estas respuestas inflamatorias menores se producen a pesar de procedimientos con una mayor duración, lo que obviamente implica también un mayor tiempo de OLV. Por lo tanto, el papel del abordaje quirúrgico y la manipulación del tejido pulmonar, parecen tener una

relación importante con el grado de respuesta inflamatoria observado independientemente del efecto debido a la OLV.

Al observar el caso concreto de las cirugía de esófago, los abordajes por VATS también han demostrado asociarse a una menor respuesta inflamatoria sistémica, así como menores complicaciones pulmonares postoperatorias [59]. Sin embargo, globalmente las cirugías esofágicas se asocian a una mayor respuesta inflamatoria respecto a los procedimientos de CRP [41], con un riesgo para el desarrollo de ALI que llega hasta el 23,8% (y 14.5% para el SDRA) en el estudio de Tandon et al. realizado sobre 168 pacientes sometidos a esofagectomías [51]. Esto supone una incidencia muy superior respecto riesgo de desarrollo de ALI tras la CRP que oscila entre el 2% [13] y el 4,5% [11] según las series. Paradójicamente, esta mayor incidencia de ALI ocurre a pesar de una menor manipulación teórica del tejido pulmonar durante las cirugías de esófago. La explicación más probable para estos resultados puede estar en relación con una mayor duración global del procedimiento quirúrgico, y también mayor tiempo de OLV que se sitúa en torno a los 75 min de media en los estudios de CRP [16] y unos 130 min en los estudios sobre cirugía esofágica [51]. Sin embargo, también hay que tener en cuenta la influencia de otros factores implicados de forma específica en el desarrollo de daño pulmonar tras la cirugía de esófago como la eventual fuga anastomótica que no resulta anecdótica, así como la mayor frecuencia de aporte de fluidos y transfusión sanguínea.

A la vista de los resultados del grupo Control, al respecto tanto de la respuesta inflamatoria como apoptótica, así como de la elevación del miRNA-182, se puede observar claramente como los cambios inducidos por la CRP se producen de forma más

acusada a nivel del pulmón izquierdo, que ha sido sometido directamente al procedimiento quirúrgico. Debido a que esta asimetría no se observa en el grupo SHAM-B, cabe suponer que la afectación cuantitativamente diferencial del pulmón izquierdo no es resultado del fenómeno de colapso y re-expansión pulmonar ni del SIR asociado, fenómenos que también suceden en ese grupo. Por lo tanto, podemos concluir que el factor diferencial más probable para explicar la diferente afectación entre ambos pulmones en el grupo control es resultado del efecto de la manipulación quirúrgica sobre el pulmón intervenido. Así mismo, las diferencias observadas entre los grupos Control y SHAM-B, donde la única variación existente es la realización del procedimiento de resección pulmonar en los primeros, nos permiten inferir la influencia aislada de la manipulación quirúrgica en la respuesta inflamatoria asociada a la CRP con OLV en ambos pulmones. Este efecto aislado, a nivel cuantitativo vendría determinado por las diferencias observadas entre las respuestas inflamatoria y apoptótica observadas entre los grupos SHAM-B y Control. Como vemos la CRP va a condicionar la aparición de edema pulmonar, algo que no observamos en el grupo SHAM-B como resultado de la OLV.

Como vemos, probablemente la OLV y manipulación quirúrgica sean las dos principales noxas intercurrentes que tienen lugar durante la CRP, y por lo tanto la respuesta inflamatoria y apoptótica observada resulte de la interacción de ambas. Según nuestros resultados, la manipulación quirúrgica resulta un factor fundamental añadido para el desarrollo de edema pulmonar.

4) EFECTO DEL SEVOFLURANO

A la vista de los resultados, el sevoflurano ha demostrado tener un efecto protector respecto al daño pulmonar, la producción de factores pro inflamatorios y pro apoptóticos. La elevación de los parámetros proinflamatorios estudiados (TNF- α , IL-1 e ICAM-1) se atenúa en el caso de recibir anestesia inhalatoria con sevoflurano durante el procedimiento, confirmando el efecto protector contra los fenómenos inflamatorios que ya había sido descrito previamente [216, 219, 220].

En investigaciones previas este efecto protector respecto a la respuesta inflamatoria tras CRP se producía forma aislada a nivel del pulmón no-dependiente [225], expuesto diferencialmente durante el aislamiento pulmonar a mayores concentraciones de sevoflurano. Sin embargo, según nuestros resultados podemos observar como el sevoflurano consigue un efecto protector significativo y similar en ambos pulmones. Sin embargo, dado que la respuesta inflamatoria observada en el grupo control es más acusada a nivel de pulmón izquierdo (TNF- α , IL-1 e ICAM-1), los valores alcanzados a las 24h en el grupo que recibió anestesia con sevoflurano son también superiores a nivel del pulmón izquierdo respecto al lado derecho. Globalmente, podemos decir que el efecto protector observado se produce de forma bilateral. Es probable que el efecto protector e inmuno-modulador del sevoflurano se encuentre más en relación con su concentración sanguínea y no tanto por la exposición local del epitelio pulmonar del pulmón dependiente. También existe la posibilidad de que la exposición inicial en ambos pulmones durante el periodo inicial de ventilación bipulmonar, antes del inicio del procedimiento quirúrgico y el bloqueo selectivo pulmonar, condicione en parte este efecto simétrico observado.

En relación a los fenómenos apoptóticos el Sevoflurano atenúa el aumento de la expresión de caspasa-3, BAX y BAD objetivados en el grupo control de forma simétrica en ambos pulmones. En el caso de Bcl-2, la disminución en los valores de esta

proteína antiapoptótica observada en el grupo control se inhibe con la administración de sevoflurano a nivel del pulmón derecho, sin embargo a nivel del pulmón izquierdo no observamos este efecto y los niveles de bcl-2 se encuentran tan reducidos como en el grupo control. Aunque el pulmón izquierdo, no-dependiente, está menos expuesto de forma local al inhalatorio después del bloqueo pulmonar, esto no parece justificar el efecto unilateral sobre bcl-2 ya que en el resto de parámetros observados no observamos este fenómeno.

Respecto a la expresión de syndecan-1, el sevoflurano protege de su degradación y desaparición a nivel del glicocálix endotelial. Si bien a nivel del pulmón derecho los valores en el grupo Sevo permanecen similares a los basales y a los de los grupos SHAM-A y SHAM-B a las 24 horas, a nivel del pulmón izquierdo el sevoflurano consigue sólo atenuar parcialmente esta reducción. La observación de este efecto del sevoflurano en ambos pulmones sobre syndecan-1, implicada de forma fundamental en el control de la hidrodinámica y permeabilidad endotelial, puede ser fácilmente correlacionada con su papel respecto al grado de edema pulmonar. Éste, prácticamente se suprime de forma completa y simétrica en ambos pulmones con la administración de sevoflurano. En estudio previos, ya se había demostrado a este respecto una disminución de la permeabilidad endotelial inducida por TNF- α [217]. Todo ello habla a favor de un efecto clínicamente relevante del sevoflurano respecto al daño pulmonar secundario a la CRP. El sevoflurano mantiene la relación peso húmedo/peso seco en valores similares a los de los grupos SHAM-A y SHAM-B donde no se observa un aumento en el grado de edema.

Otro condicionante potencial del grado de lesión pulmonar es el efecto del sevoflurano sobre los valores hemodinámicos y gasométricos, en parte como resultado del efecto del inhalatorio sobre la VPH. En nuestro estudio no hemos hallado

diferencias significativas en estos valores, ni hemodinámicos ni respecto a la oxigenación o pH arterial, entre el grupo Control y Sevo. Esto coincide con las investigaciones que descartaban un efecto relevante del sevoflurano a dosis utilizadas habitualmente en la clínica sobre la VPH [200].

La importancia del control sobre la respuesta inflamatoria en la CRP va más allá de su papel a la hora de atenuar la frecuencia y severidad del DPA. Una respuesta inflamatoria acusada puede condicionar la funcionalidad inmunológica de los pacientes en el periodo peri-operatorio. Esto puede exponerlos a una mayor susceptibilidad al desarrollo de complicaciones infecciosas, en un contexto especialmente susceptible dada la invasividad del procedimiento quirúrgico y otras técnicas asociadas (canalización de accesos vasculares, sondajes...). Adicionalmente al incremento de la susceptibilidad infecciosa, habría que destacar el papel del sistema inmune respecto a la potencial diseminación tumoral en el peri-operatorio de la CRP oncológica, siendo éste un periodo crítico [62, 235]. Así pues, un control adecuado de esta respuesta inflamatoria, puede contribuir a la adecuada preservación de la funcionalidad inmunológica antitumoral, lo que en último término podría influir en la siembra tumoral y el desarrollo potencial de metástasis [236]. Cada vez es mayor la evidencia acerca del potencial que tendrían las medidas destinadas a controlar las respuestas inflamatorias ligadas a los procedimientos quirúrgicos, pudiendo llegar éstas a tener un papel en la supervivencia de los pacientes a largo plazo [237].

Nuestro grupo de trabajo está implicado en las investigación de nuevas terapias para atenuar la respuesta inflamatoria asociada a la cirugía de resección pulmonar con ventilación unipulmonar. Previamente, ya habíamos observado la respuesta inflamatoria asociada a la cirugía de resección pulmonar tanto a nivel local como sistémico [97]. Así mismo, y en consonancia con los resultados obtenidos en este estudio ya habíamos

observado un efecto protector del sevoflurano sobre el SIR pulmonar [220]. Además, este papel inmunomodulador del sevoflurano durante un procedimiento de autotrasplante pulmonar, se traducía no sólo en un efecto sobre la respuesta inflamatoria pulmonar, si no que también se asociaba a un efecto protector a distancia, ya que demostramos una inhibición de la reacción inflamatoria y apoptótica que se producía a nivel hepático [221], atenuando a este nivel la lesión producida. El trabajo actual confirma estos hallazgos previos respecto al papel inmunomodulador del sevoflurano, y demuestra el efecto protector del inhalatorio sobre la respuesta inflamatoria local que se produce en la CRP con OLV.

Estos resultados contradicen algunos estudios que asociaban la utilización de sevoflurano durante la CRP con una mayor reacción inflamatoria [226]. Cabe destacar que la mayoría se han realizado con muestras sistémicas y no pulmonares, lo que supone probablemente una menor precisión a la hora de evaluar la respuesta inflamatoria. Además tampoco han observado diferencias a las 24 horas del procedimiento, sino únicamente durante el procedimiento y en las primeras horas posteriores. Sin embargo, en consonancia con nuestros resultados, podemos observar mayor evidencia científica, con estudios realizados en humanos sobre la respuesta inflamatoria a nivel local medida en lavados broncoalveolares [217, 224, 225]. Además, en uno de ellos este efecto protector del sevoflurano sobre la respuesta inflamatoria pulmonar, se asociaba a un menor número de complicaciones postoperatorias, lo que supone un resultado de mayor relevancia clínica[224].

Esta investigación confirma el papel protector del sevoflurano sobre la respuesta inflamatoria y apoptótica local asociada a la cirugía de resección pulmonar, así como respecto al grado de edema pulmonar observado a las 24 horas del procedimiento.

En nuestra opinión, la principal aportación de esta investigación es la caracterización del efecto concreto que provoca la ventilación unipulmonar respecto a la respuesta inflamatoria asociada a cirugía de resección pulmonar. Previamente, ya se conocía de la influencia de este procedimiento ventilatorio, pero nunca se había aislado experimentalmente el papel concreto que desempeña en la respuesta inflamatoria y apoptótica. De forma consecutiva, también hemos podido objetivar el efecto segregado de la manipulación quirúrgica sobre esta respuesta inflamatoria y apoptótica, y su implicación concreta en el daño pulmonar agudo postoperatorio. Parece claro que el efecto adicional de la manipulación quirúrgica resulta fundamental en la génesis del edema pulmonar a las 24 horas. Así mismo, podemos confirmar el distinto grado de afectación entre el pulmón sometido a ventilación unipulmonar, y aquel sometido a la vasoconstricción pulmonar y cirugía ipsilateral, en el que se produce una mayor respuesta inflamatoria y apoptótica asociada en relación a la manipulación quirúrgica.

De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer estudio experimental que aísla los efectos de la ventilación unipulmonar y la manipulación quirúrgica sobre la respuesta inflamatoria y apoptótica asociada a la cirugía de resección pulmonar.

CONCLUSIONES

- En nuestro modelo experimental en cerdos, la cirugía de resección pulmonar aumenta la expresión de mediadores de la inflamación y la apoptosis a las 24 horas, además provoca cierto grado de daño tisular en forma de edema pulmonar.

- En este modelo experimental la anestesia inhalatoria con sevoflurano durante la cirugía de resección pulmonar, disminuye el edema pulmonar, la expresión de mediadores inflamatorios y pro apoptóticos a las 24 horas del procedimiento quirúrgico.

- La cirugía de resección pulmonar provoca una degradación del glicocálix endotelial a las 24 horas. Este efecto se atenúa con la administración del Sevoflurano.

- La cirugía de resección pulmonar induce cambios en la expresión de los MicroRNAs, que se atenúan con la administración del Sevoflurano.

- La ventilación unipulmonar intraoperatoria condiciona una activación inflamatoria y pro-apoptótica en ambos pulmones, sin que ello repercuta en el grado de edema pulmonar en el intervalo de tiempo estudiado.

- La manipulación quirúrgica per sé, provoca una respuesta inflamatoria adicional que afecta a ambos pulmones, condicionando la aparición de edema pulmonar.

BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; 2:319-323.
- [2] Zeldin RA, Normandin D, Landtwing D, Peters RM. Postpneumonectomy pulmonary edema. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1984; 87:359-365.
- [3] MacCallum NS, Evans TW. Epidemiology of acute lung injury. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11:43-49.
- [4] Bernard GR, Artigas A, Brigham KL *et al.* The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994; 149:818-824.
- [5] Artigas A, Bernard GR, Carlet J *et al.* The American-European Consensus Conference on ARDS, part 2: Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. Acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 157:1332-1347.
- [6] Force ADT, Ranieri VM, Rubenfeld GD *et al.* Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012; 307:2526-2533.
- [7] Arancibia F. Nueva definición de Berlín de Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo. *Revista chilena de medicina intensiva* 2013:1-6.
- [8] Della Rocca G, Coccia C. Acute lung injury in thoracic surgery. *Current Opinion in Anaesthesiology* 2013; 26:40-46.
- [9] Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Esteban A. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 2006; 27:327-336.
- [10] Group TICCT. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in Ireland; a prospective audit of epidemiology and management. *Crit Care* 2008; 12:R30.
- [11] Licker M, Fauconnet P, Villiger Y, Tschopp J-M. Acute lung injury and outcomes after thoracic surgery. *Current Opinion in Anaesthesiology* 2009; 22:61-67.
- [12] Eichenbaum KD, Neustein SM. Acute Lung Injury After Thoracic Surgery. *YJCAN* 2012:1-10.
- [13] Ruffini E, Parola A, Papalia E *et al.* Frequency and mortality of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome after pulmonary resection for bronchogenic carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001; 20:30-36, discussion 36-37.
- [14] Kutlu CA, Williams EA, Evans TW *et al.* Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome after pulmonary resection. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 69:376-380.
- [15] Watanabe S-i, Asamura H, Suzuki K, Tsuchiya R. Recent results of postoperative mortality for surgical resections in lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* 2004; 78:999-1002; discussion 1002-1003.
- [16] Licker M, de Perrot M, Spiliopoulos A *et al.* Risk Factors for Acute Lung Injury After Thoracic Surgery for Lung Cancer. *Anesthesia & Analgesia* 2003; 97:1558-1565.
- [17] Gothard J. Lung injury after thoracic surgery and one-lung ventilation. *Current Opinion in Anaesthesiology* 2006; 19:5-10.
- [18] Tang SSK, Redmond K, Griffiths M *et al.* The mortality from acute respiratory distress syndrome after pulmonary resection is reducing: a 10-year single institutional experience☆. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2008; 34:898-902.
- [19] Johnson ER, Matthay MA. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2010; 23:243-252.

- [20] Sakamoto K, Arakawa H, Mita S *et al.* Elevation of circulating interleukin 6 after surgery: factors influencing the serum level. *Cytokine* 1994; 6:181-186.
- [21] Waller DA, Keavey P, Woodfine L, Dark JH. Pulmonary endothelial permeability changes after major lung resection. *Ann. Thorac. Surg.* 1996; 61:1435-1440.
- [22] Bigatello LM, Allain R, Gaissert HA. Acute lung injury after pulmonary resection. *Minerva Anestesiol* 2004; 70:159-166.
- [23] F Javier Belda JL. Ventilación mecánica en anestesia y cuidados críticos. 2009:1244.
- [24] Ricard J-D, Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury. *European Respiratory Journal* 2003; 22:2s-9s.
- [25] Tschumperlin DJ, Oswari J, Margulies AS. Deformation-induced injury of alveolar epithelial cells. Effect of frequency, duration, and amplitude. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 162:357-362.
- [26] Vlahakis NE, Hubmayr RD. Response of alveolar cells to mechanical stress. *Curr Opin Crit Care* 2003; 9:2-8.
- [27] Fisher JL, Levitan I, Margulies SS. Plasma Membrane Surface Increases with Tonic Stretch of Alveolar Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31:200-208.
- [28] Pugin J. Molecular mechanisms of lung cell activation induced by cyclic stretch. *Critical Care Medicine* 2003; 31:S200-S206.
- [29] Banes AJ, Tsuzaki M, Yamamoto J *et al.* Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem. Cell Biol.* 1995; 73:349-365.
- [30] Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T *et al.* Rho family small G proteins play critical roles in mechanical stress-induced hypertrophic responses in cardiac myocytes. *Circulation Research* 1999; 84:458-466.
- [31] Geiger B, Bershadsky A. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell* 2002; 110:139-142.
- [32] Oudin S, Pugin J. Role of MAP kinase activation in interleukin-8 production by human BEAS-2B bronchial epithelial cells submitted to cyclic stretch. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2002; 27:107-114.
- [33] Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, Hubmayr RD. Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *The American journal of physiology* 1999; 277:L167-173.
- [34] Uhlig U, Fehrenbach H, Lachmann RA *et al.* Phosphoinositide 3-OH kinase inhibition prevents ventilation-induced lung cell activation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2004; 169:201-208.
- [35] Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury: from barotrauma to biotrauma. *Respir Care* 2005; 50:646-659.
- [36] Gattinoni L, Protti A, Caironi P, Carlesso E. Ventilator-induced lung injury: The anatomical and physiological framework. *Critical Care Medicine* 2010; 38:S539-S548.
- [37] Uhlig S. Ventilation-induced lung injury and mechanotransduction: stretching it too far? *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2002; 282:L892-896.
- [38] Post JM, Gelband CH, Hume JR. [Ca²⁺]_i inhibition of K⁺ channels in canine pulmonary artery. Novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarization. *Circulation Research* 1995; 77:131-139.
- [39] Slinger P. Acute Lung Injury After Pulmonary Resection: More Pieces of the Puzzle. *Anesthesia & Analgesia* 2003; 97:1555-1557.

- [40] Tremblay LN, Miatto D, Hamid Q *et al.* Injurious ventilation induces widespread pulmonary epithelial expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 messenger RNA. *Critical Care Medicine* 2002; 30:1693-1700.
- [41] Baudouin SV. Lung injury after thoracotomy. *British Journal of Anaesthesia* 2003; 91:132-142.
- [42] Funakoshi T, Ishibe Y, Okazaki N *et al.* Effect of re-expansion after short-period lung collapse on pulmonary capillary permeability and pro-inflammatory cytokine gene expression in isolated rabbit lungs. *British Journal of Anaesthesia* 2004; 92:558-563.
- [43] Schilling T, Kozian A, Huth C *et al.* The pulmonary immune effects of mechanical ventilation in patients undergoing thoracic surgery. *Anesthesia & Analgesia* 2005; 101:957-965, table of contents.
- [44] Michelet P, D'Journo X-B, Roch A *et al.* Protective ventilation influences systemic inflammation after esophagectomy: a randomized controlled study. *Anesthesiology* 2006; 105:911-919.
- [45] Licker M, Diaper J, Villiger Y *et al.* Impact of intraoperative lung-protective interventions in patients undergoing lung cancer surgery. *Critical Care* 2009; 13:R41.
- [46] Jordan S, Mitchell JA, Quinlan GJ *et al.* The pathogenesis of lung injury following pulmonary resection. *Eur. Respir. J.* 2000; 15:790-799.
- [47] Grichnik KP, D'Amico TA. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome after pulmonary resection. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2004; 8:317-334.
- [48] Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest* 2002; 122:314S-320S.
- [49] Cheng Y-J, Chan K-C, Chien C-T *et al.* Oxidative stress during 1-lung ventilation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2006; 132:513-518.
- [50] Williams EA, Quinlan GJ, Goldstraw P *et al.* Postoperative lung injury and oxidative damage in patients undergoing pulmonary resection. *European Respiratory Journal* 1998; 11:1028-1034.
- [51] Tandon S, Batchelor A, Bullock R *et al.* Peri-operative risk factors for acute lung injury after elective oesophagectomy. *British Journal of Anaesthesia* 2001; 86:633-638.
- [52] Schilling MK, Gassmann N, Sigurdsson GH *et al.* Role of thromboxane and leukotriene B4 in patients with acute respiratory distress syndrome after oesophagectomy. *British Journal of Anaesthesia* 1998; 80:36-40.
- [53] Cree RTJ, Warnell I, Staunton M *et al.* Alveolar and plasma concentrations of interleukin-8 and vascular endothelial growth factor following oesophagectomy. *Anaesthesia* 2004; 59:867-871.
- [54] Her C, Mandy S. Acute respiratory distress syndrome of the contralateral lung after reexpansion pulmonary edema of a collapsed lung. *J Clin Anesth* 2004; 16:244-250.
- [55] Padley SPG, Jordan SJ, Goldstraw P *et al.* Asymmetric ARDS Following Pulmonary Resection: CT Findings Initial Observations. *Radiology* 2002; 223:468-473.
- [56] Kozian A, Schilling T, Freden F *et al.* One-lung ventilation induces hyperperfusion and alveolar damage in the ventilated lung: an experimental study. *British Journal of Anaesthesia* 2008; 100:549-559.
- [57] Rucker GM, Wiseman MS, Pearson D, Shale DJ. Neutrophil degranulation and increased pulmonary capillary permeability following oesophagectomy: a model of early lung injury in man. *The British journal of surgery* 1988; 75:883-886.

- [58] Franke A, Lante W, Kupser S *et al.* Procalcitonin levels after different types of conventional thoracic surgery. *The Thoracic and cardiovascular surgeon* 2008; 56:46-50.
- [59] Tsujimoto H, Takahata R, Nomura S *et al.* Video-assisted thoracoscopic surgery for esophageal cancer attenuates postoperative systemic responses and pulmonary complications. *Surgery* 2012; 151:667-673.
- [60] Jones RO, Anderson NH, Murchison JT *et al.* Innate immune responses after resection for lung cancer via video-assisted thoracoscopic surgery and thoracotomy. *Innovations (Philadelphia, Pa.)* 2014; 9:93-103; discussion 103.
- [61] Yim AP, Wan S, Lee TW, Arifi AA. VATS lobectomy reduces cytokine responses compared with conventional surgery. *The Annals of thoracic surgery* 2000; 70:243-247.
- [62] Craig SR, Leaver HA, Yap PL *et al.* Acute phase responses following minimal access and conventional thoracic surgery. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2001; 20:455-463.
- [63] Cross LJM, Matthay MA. Biomarkers in Acute Lung Injury: Insights into the Pathogenesis of Acute Lung Injury. *Critical Care Clinics* 2011; 27:355-377.
- [64] Zhang H, Downey GP, Suter PM *et al.* Conventional mechanical ventilation is associated with bronchoalveolar lavage-induced activation of polymorphonuclear leukocytes: a possible mechanism to explain the systemic consequences of ventilator-induced lung injury in patients with ARDS. *Anesthesiology* 2002; 97:1426-1433.
- [65] Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacological reviews* 2000; 52:349-374.
- [66] Chollet-Martin S, Montravers P, Gibert C *et al.* Subpopulation of hyperresponsive polymorphonuclear neutrophils in patients with adult respiratory distress syndrome. Role of cytokine production. *The American review of respiratory disease* 1992; 146:990-996.
- [67] Hirani N, Antonicelli F, Strieter RM *et al.* The regulation of interleukin-8 by hypoxia in human macrophages--a potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 2001; 7:685-697.
- [68] Matute-Bello G, Liles WC, Radella F *et al.* Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine* 2000; 28:1-7.
- [69] Okawa K, Onda M, Miyashita M, Sasajima K. Systemic and pulmonary responses of inflammatory cytokines following esophagectomy. *Nihon Ika Daigaku zasshi* 1998; 65:42-49.
- [70] Choudhury S, Wilson MR, Goddard ME *et al.* Mechanisms of early pulmonary neutrophil sequestration in ventilator-induced lung injury in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2004; 287:L902-910.
- [71] Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR, Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997; 155:1187-1205.
- [72] Idell S, Kucich U, Fein A *et al.* Neutrophil elastase-releasing factors in bronchoalveolar lavage from patients with adult respiratory distress syndrome. *The American review of respiratory disease* 1985; 132:1098-1105.
- [73] Fowler AA, Hyers TM, Fisher BJ *et al.* The adult respiratory distress syndrome. Cell populations and soluble mediators in the air spaces of patients at high risk. *The American review of respiratory disease* 1987; 136:1225-1231.
- [74] Weiland JE, Davis WB, Holter JF *et al.* Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. *The American review of respiratory disease* 1986; 133:218-225.

- [75] Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR *et al.* Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994; 150:113-122.
- [76] Kawano T, Mori S, Cybulsky M *et al.* Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 1987; 62:27-33.
- [77] Shasby DM, Fox RB, Harada RN, Repine JE. Reduction of the edema of acute hyperoxic lung injury by granulocyte depletion. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 1982; 52:1237-1244.
- [78] Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2003; 16:193-198.
- [79] Fan J, Ye RD, Malik AB. Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2001; 281:L1037-1050.
- [80] Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL *et al.* Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet* 1993; 341:643-647.
- [81] Schütte H, Lohmeyer J, Rosseau S *et al.* Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. *The European respiratory journal* 1996; 9:1858-1867.
- [82] Pugin J, Ricou B, Steinberg KP *et al.* Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996; 153:1850-1856.
- [83] Janz DR, Ware LB. Biomarkers of ALI/ARDS: pathogenesis, discovery, and relevance to clinical trials. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 2013; 34:537-548.
- [84] Ware LB. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 2006; 27:337-349.
- [85] Chang DM, Hsu K, Ding YA, Chiang CH. Interleukin-1 in ischemia-reperfusion acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997; 156:1230-1234.
- [86] Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K *et al.* The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2003; 125:261-272.
- [87] Clark BD, Bedrosian I, Schindler R *et al.* Detection of interleukin 1 alpha and 1 beta in rabbit tissues during endotoxemia using sensitive radioimmunoassays. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 1991; 71:2412-2418.
- [88] Sabio G, Davis RJ. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Seminars in immunology* 2014; 26:237-245.
- [89] Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science (New York, N.Y.)* 2002; 296:1634-1635.
- [90] Meduri GU, Kohler G, Headley S *et al.* Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest* 1995; 108:1303-1314.
- [91] Rich EA, Panuska JR, Wallis RS *et al.* Dyscoordinate expression of tumor necrosis factor-alpha by human blood monocytes and alveolar macrophages. *The American review of respiratory disease* 1989; 139:1010-1016.
- [92] Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C *et al.* Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999; 282:54-61.

- [93] Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G. Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001; 163:1176-1180.
- [94] Park WY, Goodman RB, Steinberg KP *et al.* Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001; 164:1896-1903.
- [95] Parsons PE, Matthay MA, Ware LB *et al.* Elevated plasma levels of soluble TNF receptors are associated with morbidity and mortality in patients with acute lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2005; 288:L426-431.
- [96] Imai Y, Kawano T, Iwamoto S *et al.* Intratracheal anti-tumor necrosis factor-alpha antibody attenuates ventilator-induced lung injury in rabbits. *J. Appl. Physiol.* 1999; 87:510-515.
- [97] Garutti I, Rancan L, Simon C *et al.* Intravenous Lidocaine Decreases Tumor Necrosis Factor Alpha Expression Both Locally and Systemically in Pigs Undergoing Lung Resection Surgery. *Anesthesia & Analgesia* 2014; 119:815-828.
- [98] Detmar M, Tenorio S, Hettmannsperger U *et al.* Cytokine regulation of proliferation and ICAM-1 expression of human dermal microvascular endothelial cells in vitro. *The Journal of investigative dermatology* 1992; 98:147-153.
- [99] Lee J-H, Del Sorbo L, Uhlig S *et al.* Intercellular adhesion molecule-1 mediates cellular cross-talk between parenchymal and immune cells after lipopolysaccharide neutralization. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2004; 172:608-616.
- [100] Mendez MP, Morris SB, Wilcoxon S *et al.* Shedding of soluble ICAM-1 into the alveolar space in murine models of acute lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2006; 290:L962-970.
- [101] Beck-Schimmer B, Schimmer RC, Warner RL *et al.* Expression of lung vascular and airway ICAM-1 after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1997; 17:344-352.
- [102] Agouridakis P, Kyriakou D, Alexandrakis MG *et al.* The predictive role of serum and bronchoalveolar lavage cytokines and adhesion molecules for acute respiratory distress syndrome development and outcome. *Respiratory research* 2002; 3:25.
- [103] Calfee CS, Eisner MD, Parsons PE *et al.* Soluble intercellular adhesion molecule-1 and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Intensive Care Med* 2008; 35:248-257.
- [104] Lundberg AH, Fukatsu K, Gaber L *et al.* Blocking pulmonary ICAM-1 expression ameliorates lung injury in established diet-induced pancreatitis. *Annals of surgery* 2001; 233:213-220.
- [105] Savery MD, Jiang JX, Park PW, Damiano ER. The endothelial glycocalyx in syndecan-1 deficient mice. *Microvascular research* 2013; 87:83-91.
- [106] Voyvodic PL, Min D, Liu R *et al.* Loss of syndecan-1 induces a pro-inflammatory phenotype in endothelial cells with a dysregulated response to atheroprotective flow. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289:9547-9559.
- [107] Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Molecules and cells* 2007; 24:153-166.
- [108] Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M *et al.* Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annual review of cell biology* 1992; 8:365-393.
- [109] Asundi VK, Erdman R, Stahl RC, Carey DJ. Matrix metalloproteinase-dependent shedding of syndecan-3, a transmembrane heparan sulfate proteoglycan, in Schwann cells. *Journal of neuroscience research* 2003; 73:593-602.

- [110] Wang L, Fuster M, Sriramarao P, Esko JD. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nature immunology* 2005; 6:902-910.
- [111] Hayashida A, Bartlett AH, Foster TJ, Park PW. Staphylococcus aureus beta-toxin induces lung injury through syndecan-1. *The American journal of pathology* 2009; 174:509-518.
- [112] Giuffrè L, Cordey AS, Monai N *et al.* Monocyte adhesion to activated aortic endothelium: role of L-selectin and heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of cell biology* 1997; 136:945-956.
- [113] Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *AJP: Cell Physiology* 2002; 282:C227-C241.
- [114] Götte M, Jousen AM, Klein C *et al.* Role of syndecan-1 in leukocyte-endothelial interactions in the ocular vasculature. *Investigative ophthalmology & visual science* 2002; 43:1135-1141.
- [115] 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. *Annals of surgery* 2011; 254:194-200.
- [116] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26:239-257.
- [117] Martin TR, Nakamura M, Matute-Bello G. The role of apoptosis in acute lung injury. *Critical Care Medicine* 2003; 31:S184-S188.
- [118] Perl M, Chung C-S, Ayala A. Apoptosis. *Critical Care Medicine* 2005; 33:S526-S529.
- [119] Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 2000; 45:528-537.
- [120] Pedreira PR, García-Prieto E, Albaiceta GM, Taboada F. [Inflammatory response and apoptosis in acute pulmonary injury]. *Med Intensiva* 2006; 30:268-275.
- [121] Zhang X. Carbon Monoxide Modulates Fas/Fas Ligand, Caspases, and Bcl-2 Family Proteins via the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway during Ischemia-Reperfusion Lung Injury. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:22061-22070.
- [122] Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 1997; 326 (Pt 1):1-16.
- [123] Lu Q, Harrington EO, Rounds S. Apoptosis and lung injury. *Keio J Med* 2005; 54:184-189.
- [124] Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 2003; 17:2481-2495.
- [125] Martin TR, Matute-Bello G. Experimental Models and Emerging Hypotheses for Acute Lung Injury. *Critical Care Clinics* 2011; 27:735-752.
- [126] Martin TR. Apoptosis and Epithelial Injury in the Lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2005; 2:214-220.
- [127] Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology* 2003; 15:725-731.
- [128] Salvesen GS, Riedl SJ. Caspase mechanisms. *Advances in experimental medicine and biology* 2008; 615:13-23.
- [129] Dejean LM, Martinez-Caballero S, Kinnally KW. Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis? *Cell death and differentiation* 2006; 13:1387-1395.

- [130] Dejean LM, Martinez-Caballero S, Guo L *et al.* Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Molecular biology of the cell* 2005; 16:2424-2432.
- [131] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116:205-219.
- [132] Matute-Bello G, Martin TR. Science review: apoptosis in acute lung injury. *Crit Care* 2003; 7:355-358.
- [133] Yuluğ E, Tekinbas C, Ulusoy H *et al.* The effects of oxidative stress on the liver and ileum in rats caused by one-lung ventilation. *The Journal of surgical research* 2007; 139:253-260.
- [134] Vion AC, Birukova AA, Boulanger CM, Birukov KG. Mechanical forces stimulate endothelial microparticle generation via caspase-dependent apoptosis-independent mechanism. *Pulmonary circulation* 2013; 3:95-99.
- [135] Oka M, Hirazawa K, Yamamoto K *et al.* Induction of Fas-mediated apoptosis on circulating lymphocytes by surgical stress. *Annals of surgery* 1996; 223:434-440.
- [136] Delogu G, Moretti S, Antonucci A *et al.* Apoptosis and surgical trauma: dysregulated expression of death and survival factors on peripheral lymphocytes. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* 2000; 135:1141-1147.
- [137] Li L, Wu W, Huang W *et al.* NF- κ B RNAi decreases the Bax/Bcl-2 ratio and inhibits TNF- α -induced apoptosis in human alveolar epithelial cells. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 2013; 62:387-397.
- [138] Bem RA, Bos AP, Matute-Bello G *et al.* Lung epithelial cell apoptosis during acute lung injury in infancy. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies* 2007; 8:132-137.
- [139] Matute-Bello G, Liles WC, Radella F *et al.* Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 156:1969-1977.
- [140] Fujita M, Kuwano K, Kunitake R *et al.* Endothelial cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1998; 117:202-208.
- [141] Hagimoto N, Kuwano K, Nomoto Y *et al.* Apoptosis and expression of Fas/Fas ligand mRNA in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16:91-101.
- [142] Kitamura Y, Hashimoto S, Mizuta N *et al.* Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 163:762-769.
- [143] Vernooy JH, Dentener MA, van Suylen RJ *et al.* Intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice induces apoptosis in bronchial epithelial cells: no role for tumor necrosis factor-alpha and infiltrating neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:569-576.
- [144] Kawasaki M, Kuwano K, Hagimoto N *et al.* Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor. *Am. J. Pathol.* 2000; 157:597-603.
- [145] Matute-Bello G, Liles WC, Steinberg KP *et al.* Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). *J. Immunol.* 1999; 163:2217-2225.
- [146] Herrero R, Tanino M, Smith LS *et al.* The Fas/FasL pathway impairs the alveolar fluid clearance in mouse lungs. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 2013; 305:L377-388.
- [147] Nakamura M, Matute-Bello G, Liles WC *et al.* Differential response of human lung epithelial cells to fas-induced apoptosis. *Am. J. Pathol.* 2004; 164:1949-1958.

- [148] Albertine KH, Soulier MF, Wang Z *et al.* Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Pathol.* 2002; 161:1783-1796.
- [149] Serrao KL, Fortenberry JD, Owens ML *et al.* Neutrophils induce apoptosis of lung epithelial cells via release of soluble Fas ligand. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2001; 280:L298-305.
- [150] Galani V, Tatsaki E, Bai M *et al.* The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review. *Pathol. Res. Pract.* 2010; 206:145-150.
- [151] Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996; 84:299-308.
- [152] Guinee D, Brambilla E, Fleming M *et al.* The potential role of BAX and BCL-2 expression in diffuse alveolar damage. *The American journal of pathology* 1997; 151:999-1007.
- [153] Korsmeyer SJ, Yin XM, Oltvai ZN *et al.* Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Biochimica et biophysica acta* 1995; 1271:63-66.
- [154] Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ *et al.* Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Seminars in cancer biology* 1993; 4:327-332.
- [155] Ng CSH. Pulmonary ischaemia-reperfusion injury: role of apoptosis. *European Respiratory Journal* 2005; 25:356-363.
- [156] de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-Reperfusion-induced Lung Injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167:490-511.
- [157] Stammberger U, Gaspert A, Hillinger S *et al.* Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 69:1532-1536.
- [158] Fischer S, de Perrot M, Liu M *et al.* Interleukin 10 gene transfection of donor lungs ameliorates posttransplant cell death by a switch from cellular necrosis to apoptosis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003; 126:1174-1180.
- [159] Martynowicz MA, Walters BJ, Hubmayr RD. Mechanisms of recruitment in oleic acid-injured lungs. *J. Appl. Physiol.* 2001; 90:1744-1753.
- [160] Dosreis GA, Borges VM, Zin WA. The central role of Fas-ligand cell signaling in inflammatory lung diseases. *J. Cell. Mol. Med.* 2004; 8:285-293.
- [161] Imai Y, Parodo J, Kajikawa O *et al.* Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 2003; 289:2104-2112.
- [162] Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 2008; 132:9-14.
- [163] Perron MP, Provost P. Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2008; 13:2537-2547.
- [164] Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes & development* 2003; 17:438-442.
- [165] Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen C-Z. Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nature reviews. Immunology* 2008; 8:120-130.
- [166] Sayed D, He M, Hong C *et al.* MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285:20281-20290.

- [167] Ouyang Y-B, Giffard RG. microRNAs affect BCL-2 family proteins in the setting of cerebral ischemia. *Neurochemistry international* 2014; 77C:2-8.
- [168] Roy S, Khanna S, Hussain S-RA *et al.* MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovascular research* 2009; 82:21-29.
- [169] Weiss JB, Eisenhardt SU, Stark GB *et al.* MicroRNAs in ischemia-reperfusion injury. *American journal of cardiovascular disease* 2012; 2:237-247.
- [170] Dharap A, Bowen K, Place R *et al.* Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2009; 29:675-687.
- [171] Ziu M, Fletcher L, Rana S *et al.* Temporal differences in microRNA expression patterns in astrocytes and neurons after ischemic injury. *PloS one* 2011; 6:e14724.
- [172] Yu C-H, Xu C-F, Li Y-M. Association of MicroRNA-223 expression with hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Digestive diseases and sciences* 2009; 54:2362-2366.
- [173] Shapiro MD, Bagley J, Latz J *et al.* MicroRNA expression data reveals a signature of kidney damage following ischemia reperfusion injury. *PloS one* 2011; 6:e23011.
- [174] Godwin JG, Ge X, Stephan K *et al.* Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107:14339-14344.
- [175] Collison A, Mattes J, Plank M, Foster PS. Inhibition of house dust mite-induced allergic airways disease by antagonism of microRNA-145 is comparable to glucocorticoid treatment. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011; 128:160-167.e164.
- [176] Yang S, Cui H, Xie N *et al.* miR-145 regulates myofibroblast differentiation and lung fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013; 27:2382-2391.
- [177] Sessa R, Hata A. Role of microRNAs in lung development and pulmonary diseases. *Pulmonary circulation* 2013; 3:315-328.
- [178] Oglesby IK, McElvaney NG, Greene CM. MicroRNAs in inflammatory lung disease--master regulators or target practice? *Respiratory research* 2010; 11:148.
- [179] O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP *et al.* MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104:1604-1609.
- [180] Sethu S, Melendez AJ. New developments on the TNF α -mediated signalling pathways. *Bioscience reports* 2011; 31:63-76.
- [181] Lorente-Cebrián S, Mejhert N, Kulyté A *et al.* MicroRNAs regulate human adipocyte lipolysis: effects of miR-145 are linked to TNF- α . *PloS one* 2014; 9:e86800.
- [182] O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106:7113-7118.
- [183] Costinean S, Sandhu SK, Pedersen IM *et al.* Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of Emicro-MiR-155 transgenic mice. *Blood* 2009; 114:1374-1382.
- [184] Pedersen IM, Otero D, Kao E *et al.* Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNF α -dependent growth of B cell lymphomas. *EMBO molecular medicine* 2009; 1:288-295.

- [185] Zhao JL, Rao DS, Boldin MP *et al.* NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108:9184-9189.
- [186] Perry MM, Moschos SA, Williams AE *et al.* Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2008; 180:5689-5698.
- [187] Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103:12481-12486.
- [188] Boldin MP, Taganov KD, Rao DS *et al.* miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *The Journal of experimental medicine* 2011; 208:1189-1201.
- [189] Feng S, Cong S, Zhang X *et al.* MicroRNA-192 targeting retinoblastoma 1 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in lung cancer cells. *Nucleic acids research* 2011; 39:6669-6678.
- [190] Zhou T, Garcia JGN, Zhang W. Integrating microRNAs into a system biology approach to acute lung injury. *Translational Research* 2011; 157:180-190.
- [191] Vaporidi K, Vergadi E, Kaniaris E *et al.* Pulmonary microRNA profiling in a mouse model of ventilator-induced lung injury. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 2012; 303:L199-207.
- [192] Yehya N, Yerrapureddy A, Tobias J, Margulies SS. MicroRNA modulate alveolar epithelial response to cyclic stretch. *BMC genomics* 2012; 13:154.
- [193] Xie T, Liang J, Guo R *et al.* Comprehensive microRNA analysis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis identifies multiple sites of molecular regulation. *Physiological genomics* 2011; 43:479-487.
- [194] Xie T, Liang J, Liu N *et al.* MicroRNA-127 inhibits lung inflammation by targeting IgG Fcγ receptor I. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2012; 188:2437-2444.
- [195] Tamarapu Parthasarathy P, Galam L, Huynh B *et al.* MicroRNA 16 modulates epithelial sodium channel in human alveolar epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2012; 426:203-208.
- [196] Cai Z-G, Zhang S-M, Zhang Y *et al.* MicroRNAs are dynamically regulated and play an important role in LPS-induced lung injury. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 2012; 90:37-43.
- [197] Khan S, Trof RJ, Groeneveld ABJ. Transpulmonary dilution-derived extravascular lung water as a measure of lung edema. *Current opinion in critical care* 2007; 13:303-307.
- [198] Naidu BV, Dronavalli VB, Rajesh PB. Measuring lung water following major lung resection. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 2009; 8:503-506.
- [199] Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2008; 295:L379-399.
- [200] Lohser J. Evidence-based management of one-lung ventilation. *Anesthesiology clinics* 2008; 26:241-272, v.
- [201] Pruszkowski O, Dalibon N, Moutafis M *et al.* Effects of propofol vs sevoflurane on arterial oxygenation during one-lung ventilation. *British Journal of Anaesthesia* 2007; 98:539-544.

- [202] Karci A, Duru S, Hepağuşlar H *et al.* Comparison of the effect of sevoflurane and propofol on oxygenation during gradual transition to one-lung ventilation. *Brazilian journal of anesthesiology (Elsevier)* 2014; 64:79-83.
- [203] Módolo NSP, Módolo MP, Marton MA *et al.* Intravenous versus inhalation anaesthesia for one-lung ventilation. *The Cochrane database of systematic reviews* 2013; 7:CD006313.
- [204] Ishibe Y, Gui X, Uno H *et al.* Effect of sevoflurane on hypoxic pulmonary vasoconstriction in the perfused rabbit lung. *Anesthesiology* 1993; 79:1348-1353.
- [205] Soncul H, Oz E, Kalaycioglu S. Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung. *Chest* 1999; 115:1672-1677.
- [206] Hardy KJ, McClure DN, Subwongcharoen S. Ischaemic preconditioning of the liver: a preliminary study. *The Australian and New Zealand journal of surgery* 1996; 66:707-710.
- [207] Ahmed LA, Salem HA, Attia AS, El-Sayed ME. Enhancement of amlodipine cardioprotection by quercetin in ischaemia/reperfusion injury in rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2009; 61:1233-1241.
- [208] Pichardo J, Chávez R, Bravo C *et al.* [Ketorolac protection in damage due to myocardial ischemia and reperfusion]. *Protección por Ketorolac en el daño producido por isquemia y reperfusión miocárdica.* 1994; 64:325-330.
- [209] Fröba G, Bracht H, Hauser B *et al.* Effects of intrarenal administration of the calcium antagonist nimodipine during porcine aortic occlusion-induced ischemia/reperfusion injury. *Shock (Augusta, Ga.)* 2008; 29:717-723.
- [210] Tanaka K, Ludwig LM, Kersten JR *et al.* Mechanisms of cardioprotection by volatile anesthetics. *Anesthesiology* 2004; 100:707-721.
- [211] Han J, Kim E, Ho WK, Earm YE. Effects of volatile anesthetic isoflurane on ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit ventricular myocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 1996; 229:852-856.
- [212] Novalija E, Fujita S, Kampine JP, Stowe DF. Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts. *Anesthesiology* 1999; 91:701-712.
- [213] Redel A, Stumpner J, Tischer-Zeitz T *et al.* Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 2009; 234:1186-1191.
- [214] Lin H-f, Zhu Z-r, Hu Z-y. [Protective effects of sevoflurane preconditioning on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats]. *Zhonghua yi xue za zhi* 2009; 89:2943-2945.
- [215] Imai M, Kon S, Inaba H. Effects of halothane, isoflurane and sevoflurane on ischemia-reperfusion injury in the perfused liver of fasted rats. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 1996; 40:1242-1248.
- [216] Liu R, Ishibe Y, Ueda M. Isoflurane-sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs. *Anesthesiology* 2000; 92:833-840.
- [217] Sun S-X, Ge B-X, Miao C-H. Effects of preconditioning with sevoflurane on TNF- α -induced permeability and activation of p38 MAPK in rat pulmonary microvascular endothelial cells. *Cell Biochem. Biophys.* 2011; 61:123-129.
- [218] Kalb R, Schober P, Schwarte LA *et al.* Preconditioning, but not postconditioning, with Sevoflurane reduces pulmonary neutrophil accumulation after lower body ischaemia/reperfusion injury in rats. *European journal of anaesthesiology* 2008; 25:454-459.
- [219] Cho EJ, Yoon JH, Hong SJ *et al.* The effects of sevoflurane on systemic and pulmonary inflammatory responses after cardiopulmonary bypass. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 2009; 23:639-645.

- [220] Casanova J, Garutti I, Simon C *et al.* The Effects of Anesthetic Preconditioning with Sevoflurane in an Experimental Lung Autotransplant Model in Pigs. *Anesthesia & Analgesia* 2011; 113:742-748.
- [221] Rancan L, Huerta L, Cusati G *et al.* Sevoflurane Prevents Liver Inflammatory Response Induced by Lung Ischemia-Reperfusion. *Transplantation* 2014; 98:1151-1157.
- [222] Ferrando C, Aguilar G, Piqueras L *et al.* Sevoflurane, but not propofol, reduces the lung inflammatory response and improves oxygenation in an acute respiratory distress syndrome model: a randomised laboratory study. *European journal of anaesthesiology* 2013; 30:455-463.
- [223] Erturk E, Topaloglu S, Dohman D *et al.* The comparison of the effects of sevoflurane inhalation anesthesia and intravenous propofol anesthesia on oxidative stress in one lung ventilation. *BioMed research international* 2014; 2014:360936.
- [224] De Conno E, Steurer MP, Wittlinger M *et al.* Anesthetic-induced improvement of the inflammatory response to one-lung ventilation. *Anesthesiology* 2009; 110:1316-1326.
- [225] Sugawara Y, Yamaguchi K, Kumakura S *et al.* Effects of sevoflurane and propofol on pulmonary inflammatory responses during lung resection. *Journal of anesthesia* 2012; 26:62-69.
- [226] Jin Y. Effects of sevoflurane and propofol on the inflammatory response and pulmonary function of perioperative patients with one-lung ventilation. *Exp Ther Med* 2013; 6:781-785.
- [227] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 1987; 162:156-159.
- [228] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 2001; 25:402-408.
- [229] Gu Y, Li M, Zhang K *et al.* Identification of suitable endogenous control microRNA genes in normal pig tissues. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* 2011; 82:722-728.
- [230] Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* 2002; 111:635-646.
- [231] Zhang J, Guo H, Zhang H *et al.* Putative tumor suppressor miR-145 inhibits colon cancer cell growth by targeting oncogene Friend leukemia virus integration 1 gene. *Cancer* 2011; 117:86-95.
- [232] Song L, Liu L, Wu Z *et al.* TGF- β induces miR-182 to sustain NF- κ B activation in glioma subsets. *The Journal of clinical investigation* 2012; 122:3563-3578.
- [233] Hirata H, Ueno K, Shahryari V *et al.* MicroRNA-182-5p promotes cell invasion and proliferation by down regulating FOXF2, RECK and MTSS1 genes in human prostate cancer. *PLoS one* 2013; 8:e55502.
- [234] Tekinbas C, Ulusoy H, Yuluğ E *et al.* One-lung ventilation: for how long? *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2007; 134:405-410.
- [235] Pollock RE, Lotzová E, Stanford SD. Surgical stress impairs natural killer cell programming of tumor for lysis in patients with sarcomas and other solid tumors. *Cancer* 1992; 70:2192-2202.
- [236] Orozco HD, Garutti I, Moraga FJG, Sánchez-Pedrosa G. [Perioperative tumour dissemination. 1. Influence of perioperative factors]. *Diseminación tumoral perioperatoria. 1. Influencia de los factores perioperatorios.* 2012; 59:259-266.
- [237] Sánchez-Pedrosa G, Garutti I, Moraga FJG, Orozco HD. [Perioperative tumour dissemination. 2. Effects of anaesthesia and analgesia]. *Diseminación tumoral perioperatoria. 2. Efectos de la anestesia y analgesia.* 2012; 59:267-275.