

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Preacondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión  
en la lobectomía pulmonar.

Un estudio sobre la prevención del estrés oxidativo

Doctoranda: Laura Angelina Bruno Carlos  
Directores: Dr. José García de la Asunción y Dr. Genaro Galán Gil  
Tutor: Dr. Luís Prieto Andrés  
Programa de Doctorado en Medicina  
Valencia, 2015





## FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**D. José García de la Asunción**, Doctor en Medicina y Facultativo Especialista del Servicio de Anestesiología y Reanimación del Hospital Clínico Universitario de Valencia,

**D. Genaro Galán Gil**, Doctor en Medicina y Jefe de Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

**D. Luís Prieto Andrés**, Doctor en Medicina, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Jefe de Servicio de Alergología del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia,

CERTIFICAN:

Que Doña LAURA ANGELINA BRUNO CARLOS, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección la tesis: ***“Preacondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión en la lobectomía pulmonar. Un estudio sobre la prevención del estrés oxidativo”*** para la obtención del Grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, a 30 de Octubre de 2015.

Fdo. D. José García de la Asunción      Fdo. D. Genaro Galán Gil      Fdo D. Luís Prieto Andrés



# **AGRADECIMIENTOS**



## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento, en primer lugar, a los directores de esta tesis:

- D. **Jose García de la Asunción**, por su generosidad al compartir conmigo parte de su camino en la investigación sobre el preacondicionamiento en anestesia. Le agradezco su confianza, su tesón y su esfuerzo para que este proyecto saliera adelante. Pero sobretodo, agradezco su paciencia para esperar que la tesis encajara en mi proyecto de vida.
- D **Genaro Galán Gil**, por involucrarse e involucrar al Servicio de Cirugía Torácica en esta empresa. Con la actual presión asistencial es encomiable colaborar en un estudio cuya logística interfiere en el tiempo de uso del quirófano. Su visión desde “el otro lado”, ha sido inestimable en esta tesis.
- D. **Luis Prieto Andrés**, por aceptar ser Tutor de esta tesis, pero fundamentalmente, por sembrar en mi la curiosidad por la investigación. Su capacidad de análisis y su trabajo siempre impecable, son un ejemplo para cualquiera que quiera iniciarse en esta apasionante faceta del trabajo del médico

Esta tesis doctoral no se entendería sin la figura del Dr. D. **Javier Belda Nacher**, Jefe del Servicio de Anestesiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Su visión científica de la anestesiología y los cuidados críticos, su empeño en generar conocimiento y su espíritu docente, han sido claves en mi formación como especialista.

Al Dr. **Jaime Pérez Griera**, médico adjunto del Servicio de Laboratorio de Bioquímica del Hospital Clínico Universitario de Valencia por su dedicación y trabajo “en la sombra”. Sin su metódico trabajo este estudio no hubiera sido posible

Tampoco hubiera sido posible sin la colaboración de todos los residentes y los médicos adjuntos del quirófano de cirugía torácica y de reanimación, que han colaborado desinteresadamente para que se recogieran las muestras de forma adecuada. Un agradecimiento especial para Miguel, Blanca, Mario y Luisa.

Mi sincero agradecimiento para todos los pacientes y sus familias, especialmente, cuando en circunstancias muy difíciles colaboran en los proyectos de investigación.

Nada hubiera sido posible sin la maravillosa familia que tengo. Mis padres y mis abuelas no han escatimado esfuerzos en mi formación académica y personal. Nada de lo que pueda escribir va a ser suficiente para expresar el amor y el respeto que les profesó. A mis hermanas, Isabel y Teresa, les agradezco su empeño infatigable en hacer mi vida más fácil.

Agradezco a Sebas y a Lourdes su alegría. Son la motivación que hace que todo el esfuerzo cobre sentido. Y agradezco a Sebastián su tiempo y creer siempre en mí. Gracias por querer crecer cada día conmigo.



*Dedicada a Isabel Carlos Chulvi, mi madre*



# ÍNDICE



# ÍNDICE

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.MARCO TEÓRICO .....	Pág. 13
1.1 Concepto de radical libre y estrés oxidativo.....	Pág. 13
1.1.1 Radicales libres del oxígeno .....	Pág. 15
1.1.2 Fuentes de radicales libres del oxígeno.....	Pág. 17
1.1.3 Radicales libres del nitrógeno .....	Pág. 19
1.1.4 Sistemas antioxidantes .....	Pág. 20
1.1.4.1 Sistemas enzimáticos .....	Pág. 21
1.1.4.2 Sistemas no enzimáticos .....	Pág. 24
1.1.5 Estrés oxidativo .....	Pág. 26
1.1.5.1 Estrés oxidativo y daño a biomoléculas.....	Pág. 27
1.1.5.2 Indicadores de estrés oxidativo .....	Pág. 28
1.1.5.3 Indicadores de estrés nitrosativo.....	Pág. 36
1.2 Fenómeno de isquemia-reperusión (IR.....	Pág. 37
1.2.1 Relación entre IR y estrés oxidativo.....	Pág. 39
1.2.2 Lesión pulmonar por IR.....	Pág. 42
1.3 Particularidades de la cirugía de lobectomía pulmonar.....	Pág. 44
1.3.1 Relación ventilación perfusión en condiciones fisiológicas .....	Pág. 45
1.3.2 Cambios en la relación ventilación/perfusión durante la lobectomía pulmonar.....	Pág. 47
1.3.1 Mecanismos de lesión pulmonar durante la cirugía de resección .....	Pág. 48
1.4 Preacondicionamiento remoto por IR (RIPC.....	Pág. 53
1.4.1 Mecanismo de acción de RIPC .....	Pág. 56
1.5 Condensado del aire exhalado (CAE.....	Pág. 61
1.5.1 Composición de las muestras de CAE .....	Pág. 61
1.5.2 Marcadores de estrés oxidativo en CAE .....	Pág. 63
1.5.3 Recogida de CAE .....	Pág. 67
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	Pág. 69
2.1 Hipótesis de trabajo.....	Pág. 69
2.2 Objetivos.....	Pág. 70

## **CAPÍTULO II: METODOLOGÍA**

1. PACIENTES .....	Pág. 74
2. PROTOCOLO DE ADMINISTRACIÓN DE ANESTESIA Y MONITORIZACIÓN Pág. 75	
3. PROTOCOLO QUIRÚRGICO .....	Pág. 77
4. ALEATORIZACIÓN Y ENMASCARAMIENTO .....	Pág. 79
5. PROTOCOLO DE PREACONDICIONAMIENTO REMOTO .....	Pág. 79
6. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE.....	Pág. 79
7. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CAE.....	Pág. 81
8. MEDICIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	Pág. 82
8.1.Determinación de 8-isoprostano.....	Pág. 82
8.2.Determinación de nitritos/nitratos .....	Pág. 86
8.3. Determinación de peróxido de hidrógeno .....	Pág. 88
8.4.Determinación de pH en CAE .....	Pág. 88
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	Pág. 88

## **CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**

1. RESULTADOS.....	Pág. 94
1.1 Descripción de la muestra .....	Pág. 94
1.2 Preacondicionamiento remoto y estrés oxidativo .....	Pág. 97
1.2.1 Resultados en CAE .....	Pág. 97
1.2.2 Resultados en plasma .....	Pág. 102
1.2.3 Resultados clínicos.....	Pág. 104
1.2.4 Tiempo de VUP y estrés oxidativo .....	Pág. 105
2. DESARROLLO ARGUMENTAL .....	Pág. 109
2.1 Preacondicionamiento remoto y estrés oxidativo .....	Pág. 110
2.1.1 Marcadores en CAE.....	Pág. 110
2.1.2 Marcadores en plasma.....	Pág. 115
2.1.3 Parámetros clínicos.....	Pág. 117
2.1.4 Estrés oxidativo y duración de la VUP .....	Pág. 120
2.2 Consideraciones. Sesgos y limitaciones.....	Pág. 121

**CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES..... Pág. 130**

**CAPÍTULO V: FUTURAS INVESTIGACIONES..... Pág. 134**

**CAPÍTULO VI: ANEXOS .....** Pág. 138

**CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA .....** Pág. 144

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Indicadores de estrés oxidativo.....	Pág. 29
<b>Tabla 2:</b> Mecanismos implicados en el daño por Isquemia-Reperfusión .....	Pág. 38
<b>Tabla 3:</b> Ensayos clínicos con RIPC .....	Pág. 55
<b>Tabla 4:</b> Características basales de los pacientes.....	Pág. 95
<b>Tabla 5:</b> Datos hemodinámicos. Parámetros sanguíneos durante el estudio .....	Pág. 96
<b>Tabla 6:</b> Valores de isoprostanos (pg/ml) en plasma y CAE, en el grupo control .....	Pág. 103
<b>Tabla 7:</b> Valores de Nitritos/nitratos (mmol/ml) en plasma y CAE, en el grupo control.....	Pág. 104
<b>Tabla 8:</b> Correlación entre los tiempos de VUP y marcadores de estrés oxidativo .....	Pág. 105

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Generación de especies radicales de oxígeno. Reducción tetravalente del oxígeno a agua.....	Pág. 15
<b>Figura 2:</b> Cadena respiratoria mitocondrial .....	Pág. 18
<b>Figura 3:</b> Ciclo del Glutathion .....	Pág. 23
<b>Figura 4:</b> Principales mecanismos antioxidantes .....	Pág. 25
<b>Figura 5:</b> Disbalance entre RLO y mecanismos antioxidantes .....	Pág. 27
<b>Figura 6:</b> Productos de la lipoperoxidación del ácido araquidónico .....	Pág. 33
<b>Figura 7:</b> Metabolismo del oxígeno durante la IR.....	Pág. 40
<b>Figura 8:</b> Formación de RLO durante la IR pulmonar .....	Pág. 41

<b>Figura 9:</b> Activación de los mecanismos inflamatorios durante la reperfusión...	Pág. 44
<b>Figura 10:</b> Representación de la <i>compliance</i> regional alveolar en bipedestación y en decúbito lateral.....	Pág. 45
<b>Figura 11:</b> Distribución de la perfusión pulmonar .....	Pág. 46
<b>Figura 12:</b> Cambios en la ventilación/perfusión en paciente anestesiado .....	Pág. 48
<b>Figura 13:</b> Factores que contribuyen a la lesión pulmonar durante la cirugía de resección pulmonar .....	Pág. 53
<b>Figura 14:</b> Mecanismos celulares del preacondicionamiento isquémico .....	Pág. 57
<b>Figura 15:</b> Mecanismos implicados en RIPC.....	Pág. 60
<b>Figura 16:</b> Formación de una muestra de CAE.....	Pág. 62
<b>Figura 17:</b> Técnicas analíticas para determinar isoprostanos en CAE.....	Pág. 65
<b>Figura 18:</b> Dispositivo para recogida de muestras de CAE.....	Pág. 68
<b>Figura 19:</b> Paciente posicionado para cirugía de resección pulmonar .....	Pág. 75
<b>Figura 20:</b> Tiempos del estudio .....	Pág. 80
<b>Figura 21:</b> Dispositivo para recogida de CAE.....	Pág. 81
<b>Figura 22:</b> Tiempos de recogida de CAE.....	Pág. 82
<b>Figura 23:</b> Preparación de los estándares de 8-isoprostano.....	Pág. 84
<b>Figura 24:</b> Curva estándar de 8-isoprostano .....	Pág. 85
<b>Figura 25:</b> Correlación entre el tiempo de VUP y 8-isoprostano en CAE .....	Pág. 107
<b>Figura 26:</b> Valores de 8-isoprostano en plasma y en CAE, desglosados por pacientes .....	Pág. 116
<b>Figura 27:</b> Valores de nitritos/nitratos en plasma y en CAE, desglosados por pacientes .....	Pág. 117



## ABREVIATURAS Y SIGLAS

ALI:	Lesión pulmonar aguda ( <i>acute lung injury</i> )
ARDS:	Síndrome de distres respiratorio agudo ( <i>Acute respiratory distress syndrome</i> )
ASA:	<i>American Society of Anesthesia</i>
ATP:	Adenosin 5'-trifosfato.
CO <sub>2</sub> :	Dióxido de carbono.
DNA:	Ácido desoxrrribonucleico.
EDTA:	Ácido etilendiamino tetraacético.
ELWI:	Índice de agua extravascular pulmonar ( <i>Extravascular lung water index</i> )
ETCO <sub>2</sub> :	<i>End tidal CO<sub>2</sub></i>
FADH <sub>2</sub> :	Flavinadenindinucleótido (reducido).
FiO <sub>2</sub>	Fracción inspiratoria de oxígeno
GSH:	Glutation reducido.
GSSG:	Glutation oxidado.
GS-T:	Glutation S-transferasa.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de hidrógeno.
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución.
IL-1:	Interleukina-1.
IR	Isquemia-reperfusión
MDA:	Malondialdehído
NADH:	Nicotinadenindinucleótido (reducido).
NADPH:	Nicotinadenindinucleótido fosfato.
NAD <sup>+</sup> :	Nicotinadenindinucleótido..
NO <sub>2</sub> :	Radical dióxido de nitrógeno.
NO:	Óxido nítrico.
NOS:	Óxido nítrico sintetasa.
O <sub>2</sub> :	Oxígeno.
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	Anión superóxido
OH:	Radical hidroxilo.
PaO <sub>2</sub> :	Presión arterial de oxígeno.

PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> :	Ratio presión arterial de oxígeno/fracción inspiratoria de oxígeno.
PaCO <sub>2</sub> :	Presión arterial de dióxido de carbono.
PKC:	Proteincinasa C
PKG	Proteincinasa G
RLO:	Radicales libres de oxígeno.
SpO <sub>2</sub> :	Saturación de oxígeno por pulsioximetría.
SOD:	Superóxido dismutasa.
TNFα:	Factor de necrosis tumoral α.
VUP:	Ventilación unipulmonar
XOR:	Xantina oxidorreductasa.
XO:	Xantina oxidasa.
XDH:	Xantina deshidrogenasa.





# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



A pesar de los avances en la anestesiología de las últimas décadas y de los cuidados postoperatorios, los resultados perioperatorios no han cambiado en la misma medida, y la mortalidad postoperatoria permanece mas alta de lo que cabría esperar (1). En EEUU, Semel *et al* (2) investigaron el riesgo de complicaciones postoperatorias entre 1996 y 2006. En los diez años de duración del estudio, la mortalidad a 30 días de cualquier causa había disminuido, pero todavía existía una tasa de 1.32%, lo que suponía la tercera causa de muerte en dicho país, por detrás de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer.

La causa subyacente de mortalidad, independientemente del tipo de cirugía es el síndrome de fallo multiorgánico, que es responsable del 47-53% de muertes en los pacientes críticos (3). A diferencia de lo que sucede en las unidades de cuidados intensivos, donde la sepsis es la causa principal del fallo multiorgánico, en los pacientes quirúrgicos, la respuesta inflamatoria sistémica está en la base de la disfunción primaria del órgano (4).

La prevención del daño tisular asociado a la cirugía se ha intentado realizar mediante diferentes intervenciones farmacológicas e instrumentales. El preacondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión es un método basado en mecanismos fisiológicos, inocuo y económico que ha demostrado en estudios previos en el ámbito experimental y clínico que confiere protección a diferentes órganos frente a un ulterior insulto por isquemia-reperfusión.

El trabajo que aquí se expone, nace del afán de mejorar el pronóstico de los pacientes con neoplasia pulmonar sometidos a una cirugía de resección lobar. Intentando una mejor evolución postquirúrgica desde el momento en que el paciente recibe la inducción anestésica. Se trata de una empresa apasionante, que da otra dimensión al trabajo del anestesiólogo y trasciende las paredes del quirófano.

Cuando se diseñó este proyecto, no había ningún estudio publicado que hubiese estudiado el efecto de precondicionamiento remoto por isquemia reperfusión en pacientes sometidos a lobectomía pulmonar por una neoplasia del pulmón. Muy recientemente, se ha publicado un estudio que valora parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo (5). Sin embargo, a diferencia de esta tesis, el único marcador de estrés oxidativo que se estudia es el malondialdehído y además solamente en plasma. La originalidad de nuestro trabajo consiste en demostrar que el colapso pulmonar y la posterior reexpansión pulmonar tras la lobectomía pulmonar, produce un aumento de los niveles de estrés oxidativo en el pulmón operado. Para ello hemos utilizado una metodología no invasiva, obteniendo el condensado del aire exhalado, procedente directamente de la vía aérea, y determinando los niveles de varios marcadores de estrés oxidativo. Y simultáneamente medir también estos mismos niveles de marcadores en la sangre. Pero además, correlacionarlo con la duración del colapso pulmonar durante la cirugía.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Conceptos de Radical Libre y Estrés oxidativo

El oxígeno molecular se encuentra normalmente en el organismo en su forma más estable que es la molécula diatómica  $O_2$ . Sin embargo en determinadas condiciones, por acción enzimática o por radiaciones ionizantes se pueden producir una serie de especies químicas altamente reactivas con otras moléculas del organismo y como consecuencia se provoca un daño oxidativo celular. Estas especies se conocen como radicales libres. Los radicales libres se están generando continuamente en aquellas células expuestas a un ambiente aerobio. La formación de cierta tasa de radicales libres en las células es un proceso normal e inevitable (6).



Un radical libre de oxígeno (RLO) es una molécula o fragmento molecular que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo. Los RLO son especies altamente reactivas por la tendencia del radical a conseguir un estado energético más favorable, emparejándose el electrón desapareado con otro de sentido de rotación opuesto. El tiempo de reacción radical-radical o radical-molécula es muy alta y depende de la constante de la reacción y la concentración de especies que reaccionan. Esta alta reactividad condiciona que la vida de los radicales libres sea breve, del orden de milisegundos. Cuando un RLO reacciona con un no radical, este pierde un electrón y se convierte en otro radical. Se crea una reacción en cadena que puede perpetuar la existencia de radicales libres que producen daño celular.

Las especies reactivas de oxígeno están bajo control de una serie de antioxidantes de tipo enzimático como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. También existen antioxidantes no enzimáticos e inespecíficos como las vitaminas E y C, el ácido úrico, la taurina, los beta-carotenos y el alfa-tocoferol que son productos naturales capaces de inactivar los RLO sin generar otros, son los llamados *scavengers*. Esto condiciona una situación conocida como estrés oxidativo. El estrés oxidativo se caracteriza por un desequilibrio del balance prooxidantes y antioxidantes a favor de los primeros (7).

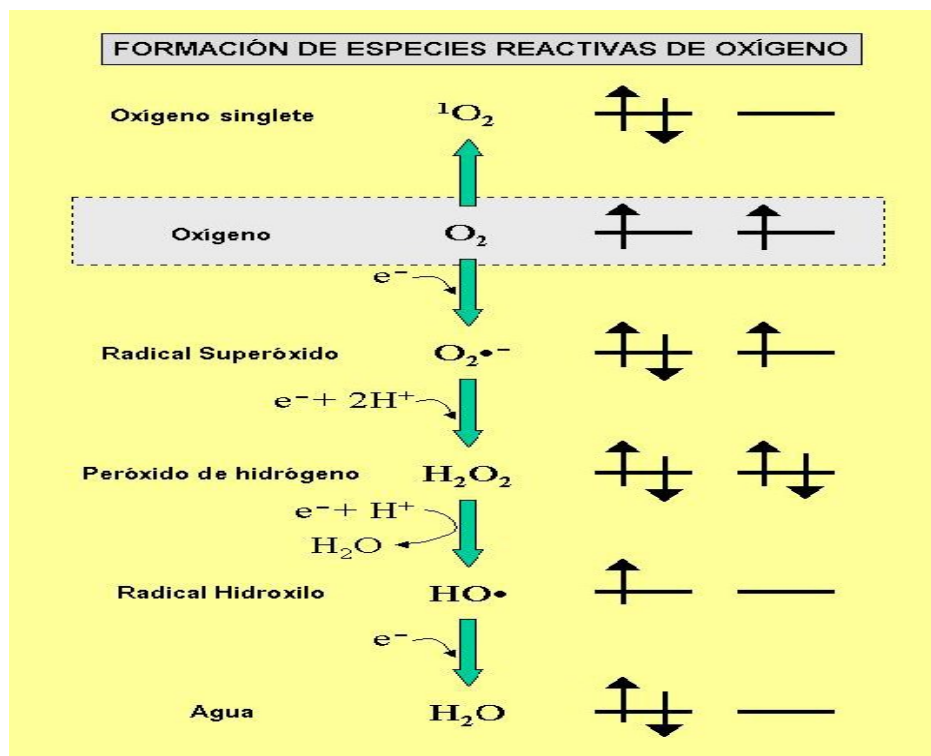
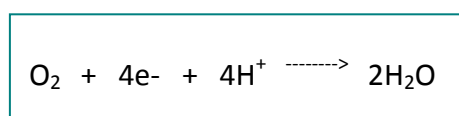


Figura 1. Generación de especies radicales de oxígeno. Reducción tetravalente del oxígeno a agua Modificado de Cytokine bulletin. R&D System, 1996.

### 1.1.1 RADICALES LIBRES DE OXIGENO

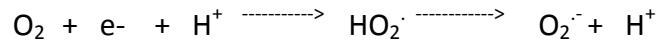
Las principales sustancias oxidantes en los sistemas biológicos son los radicales libres. Entre los radicales de oxígeno encontramos el radical superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), el peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\text{OH}\bullet$ ).

La reacción habitual de la molécula de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) es su reducción, por el aporte de 4 electrones por parte de un reductor, en una reacción tipo:

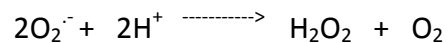


Los RLO son metabolitos tóxicos que representan estados intermedios de la reducción electroquímica del oxígeno a agua.

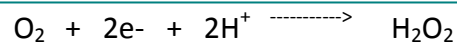
Si la molécula de oxígeno recibe un solo electrón se forma inicialmente el radical perhidroxilo ( $\text{HO}_2\cdot$ ), que se ioniza para formar el radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ):



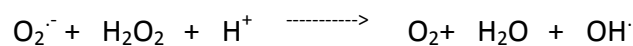
El radical superóxido tiene una vida media de algunos milisegundos y es relativamente inestable. Puede producir reacciones de dismutación, estas consisten en la reacción entre dos radicales superóxido para dar peróxido de hidrógeno y oxígeno.



Cuando una molécula de oxígeno recibe 2 electrones el producto que se forma es el agua oxigenada (peróxido de hidrógeno).



La adición directa de 3 electrones a una molécula de oxígeno no es posible. Pero puede generarse a partir de otras reacciones:



Se considera que la mayor potencia oxidante corresponde al radical hidroxilo, y en orden descendente, al peróxido de hidrógeno y al radical superóxido.

Existen radicales de oxígeno que proceden de la peroxidación lipídica (radical alcoxilo  $\text{LO}\cdot$ , radical peróxilo  $\text{LOO}\cdot$ ). Otro derivado del oxígeno es el ozono ( $\text{O}_3$ ) que se encuentra en las capas altas de la atmósfera y puede reaccionar con sustancias químicas, produciendo daño oxidativo a lípidos y proteínas (8).

### 1.1.2 FUENTES DE RLO

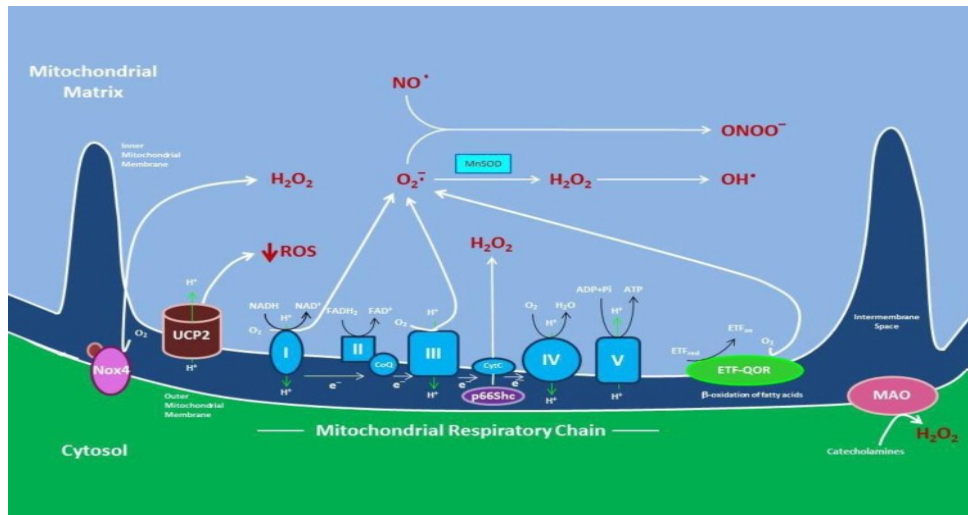
La mayor fuente intracelular de RLO son las mitocondrias a través de la cadena respiratoria, que libera energía en el llamado proceso de fosforilación oxidativa (sobre todo los complejos I y III). Gran parte del oxígeno que llega a las células es reducido en el interior de las mitocondrias por el sistema de la citocromo oxidasa. El 2-3% de los electrones de la cadena respiratoria provenientes del NADH por la incompleta reducción del oxígeno se desvían hacia la formación de RLO.

Los RLO también pueden generarse a partir de procesos del propio metabolismo celular, por ejemplo a partir de la vía sintética del ácido úrico (mediante la actividad catalítica de la enzima xantina oxidoreductasa) y por los fagocitos activados (9). Existen fuentes exógenas de RLO procedentes de la dieta, tabaco, ozono (10, 11).

#### **Fosforilación oxidativa**

La fosforilación oxidativa implica a 5 complejos enzimáticos (I al V) de la membrana interna mitocondrial. El complejo I (NADH-Ubiquinona-oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa) capta electrones del NADH. El complejo II (Succinato-Ubiquinona – oxidoreductasa) capta electrones del succinato. Ambos complejos transportan los electrones hacia la coenzima Q (ubiquinona). Desde el coenzima Q, los electrones fluyen hacia el complejo III (Ubiquinona-citocromo c-oxidoreductasa) y después los electrones se transfieren al citocromo C. Luego los electrones fluyen desde este último hacia el complejo IV (citocromo C oxidasa) y finalmente hacia el oxígeno molecular para formar agua (12).

El flujo de electrones a través de cada uno de estos complejos permite el bombeo de protones desde la matriz al lado citosólico de la membrana interna mitocondrial. La fuerza motriz se debe a un gradiente de pH (el lado del citosol es ácido) y a un potencial de membrana (el lado del citosol tiene carga positiva).



**Figura 2: Cadena respiratoria mitocondrial (13)**

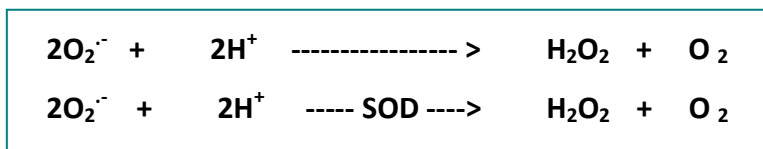
La ATP sintasa (complejo V) dirige la síntesis de ATP. Este complejo enzimático consiste en una unidad hidrofóbica  $F_0$  que conduce los protones a través de la membrana y una unidad hidrofílica  $F_1$  que cataliza la síntesis de ATP. Se forman tres moléculas de ATP por cada NADH oxidado. Y sólo se forman dos moléculas de ATP si se oxida el  $FADH_2$ . La entrada de ADP en la mitocondria está acoplada a la salida de ATP mediante un proceso llamado difusión facilitada por intercambio. El NADH y el  $FADH_2$  sólo se oxidan si el ADP se fosforila simultáneamente a ATP. Este acoplamiento se conoce como control respiratorio.

La generación del radical superóxido por la mitocondria, se produce cuando los transportadores de electrones de la cadena respiratoria, localizados en la membrana interna mitocondrial, están altamente reducidos. Esto puede ocurrir normalmente a nivel de los complejos I y III (NADH-Ubiquinona-oxidoreductasa y Succinato-Ubiquinona-oxidoreductasa). Es aquí donde los sustratos dadores de electrones y protones tienen acceso a la cadena respiratoria. Se necesita un potencial redox claramente reductor.

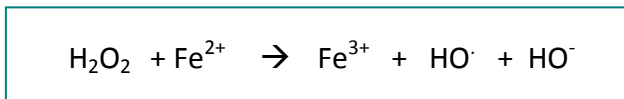
Así como el complejo IV mantiene unidas a su centro todas las formas de oxígeno parcialmente reducidas hasta la formación de agua. Los demás complejos sí tienen la capacidad de transferir directamente un electrón al  $O_2$  con la consiguiente generación de RLO.

El oxígeno molecular más un electrón dará un anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), a su vez éste puede dar lugar a peróxido de hidrógeno, bien espontáneamente o por acción de la

superóxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrógeno puede salir al citoplasma y generar más RLO. Se discute si el radical superóxido puede escapar a la SOD intramitocondrial y actuar fuera de las mitocondrias.



Como en el interior de la mitocondria no existe catalasa, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede difundir fuera de la mitocondria o bien da lugar a la formación de radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) en presencia de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) mediante las reacciones de Haber-Weis y de Fenton (14).



### 1.1.3 RADICALES LIBRES DE NITRÓGENO

Conocemos tres tipos de compuestos derivados del nitrógeno (RLN): el óxido nítrico ( $\text{NO}^{\cdot}$ ), el peróxido de nitrógeno ( $\text{ONOO}^-$ ) y el dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^{\cdot}$ ). En 1980 Fuurchgott y Zawdzki evidenciaron la existencia del llamado “factor relajante de endotelio”. En 1987 Palmer y Moncada descubrieron que ese factor era el óxido nítrico (15). El óxido nítrico es un gas incoloro, poco soluble en agua y fácilmente oxidable. Contiene un electrón desapareado en su capa exterior lo que le convierte en un radical libre. Su vida media es de 3-6 segundos. Para su síntesis, la óxido nítrico sintetasa (NOS) cataliza la oxidación de la L-arginina generando citrulina, óxido nítrico y anión superóxido; esta es la principal fuente de RLN en mamíferos (16).

El  $\text{NO}^{\cdot}$  actúa activando a la guanilciclase e incrementa el GMPc de la célula del músculo liso vascular. La GMPc activa fosforila las cadenas de miosina relajando el músculo liso vascular. Aparte de ser un potente vasodilatador, el  $\text{NO}^{\cdot}$  presenta múltiples

acciones biológicas, inhibe la mitogénesis, inhibe la adherencia leucocitaria y la interacción de las plaquetas con el endotelio vascular (17, 18). La NOS necesita como sustrato L-arginina, oxígeno y NADP; como cofactores necesita al grupo hemo, tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ), flavinadeninnucleótido y flavinamononucleótido. Existen diversos factores que activan la NOS (19): acetilcolina, bradikinina, leucotrienos, mastocitos, aminoácidos, iones de calcio, polimorfonucleares, endotoxinas, citoquinas, etc.

El  $NO\cdot$  puede reaccionar con el anión superóxido para formar el peróxido de nitrógeno ( $ONOO^-$ ). El peróxido de nitrógeno no es un radical pero es muy reactivo, capaz de inducir la peroxidación lipídica, degradar carbohidratos y fragmentar el DNA.

Una vía importante “*in vivo*” de descomposición del peróxido de nitrógeno es su reacción con el  $CO_2$  (20). Esta reacción da como compuesto final el  $N_2O_3$ . El peróxido de nitrógeno también es capaz de reaccionar con los residuos  $-OH$  de residuos de tirosina (nitración) o con grupos  $-SH$  de residuos de cisteína (s-nitrosilación)

El dióxido de nitrógeno ( $NO_2\cdot$ ) es un radical libre que puede producirse a partir de la oxidación del  $NO\cdot$  atmosférico es capaz de inducir la peroxidación lipídica y la ruptura de cadenas de ADN

#### **1.1.4 SISTEMAS ANTIOXIDANTES**

A pesar del papel fisiológico que desempeñan los RLO también dan lugar a reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes. Desde un punto de vista químico, los antioxidantes se clasifican según en sistemas enzimáticos o no enzimáticos.

##### **1.1.4.1 Sistemas enzimáticos.**

La catalasa, la superóxido dismutasa (SOD) y las enzimas del ciclo redox del glutatión son las primeras defensas intracelulares para hacer frente al estrés oxidativo.

### **A) Catalasa**

La catalasa es una enzima ferroporfirínica que se localiza en los peroxisomas (80%) y en el citosol. La catalasa reduce el peróxido de hidrógeno para formar oxígeno molecular y agua. Esta reacción es beneficiosa para la célula porque en ella se utiliza la misma molécula como oxidante y como reductor, sin necesidad de utilizar donantes endógenos de electrones. La afinidad de la catalasa por el peróxido de hidrógeno es baja, por lo que se requieren altas concentraciones para su descomposición. Su concentración plasmática es baja, abunda en el hígado y en los hematíes. Además posee una actividad peroxidasa, catalizando reacciones en las que se consume el peróxido de hidrógeno a expensas de la oxidación de un sustrato endógeno (metano, fenol, etanol) y en las que no hay producción de oxígeno molecular (21). La afinidad de la catalasa por el peróxido de hidrógeno es baja, por lo que se requieren altas concentraciones para su descomposición.

### **B) Superóxido Dismutasa**

Las superóxido dismutasa (SOD) son un grupo de metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno, incrementando en 10.000 veces la reacción de dismutación espontánea (22). Son antioxidantes al eliminar al radical superóxido y son prooxidantes al favorecer potencialmente la reacción de Haber-Weiss.

Hay descritas 4 formas diferentes de SOD. Una que se encuentra principalmente en el citosol, y contiene cobre y zinc. Se localiza a altas concentraciones en hígado, cerebro y testículos y a más baja concentración en eritrocitos, pulmón y páncreas. Hay dos SOD que contienen manganeso, una de las cuales se encuentra en la matriz mitocondrial (también en altas concentraciones en el plasma humano y en la mayoría de los tejidos) y la otra ha sido aislada sólo en bacterias. El cuarto tipo contiene hierro.



### C) El ciclo del glutatión

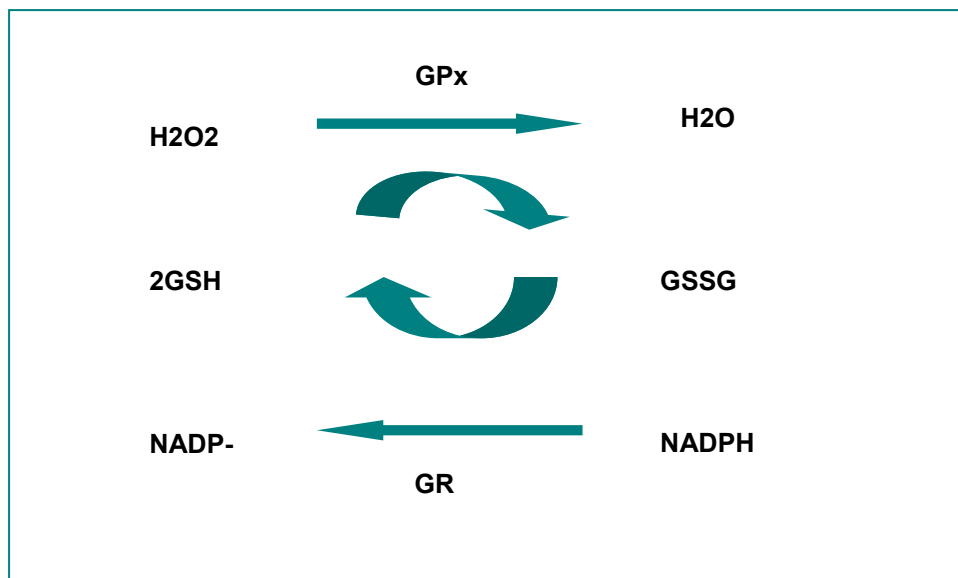
Es un mecanismo central en la protección celular frente al estrés oxidativo. El glutatión (GSH) fue descubierto por Hopkins en 1921. Es el tiol no proteico soluble en el citoplasma más abundante en las células animales y se sintetiza casi en su totalidad en el hígado. Constituido por tres aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina, sus propiedades fisiológicas derivan de sus propiedades químicas. Contiene un grupo tiol (-SH de la cisteína) y un enlace gamma-glutamilo.

La enzima glutatión peroxidasa (GPx) es la enzima central del ciclo del glutatión. Este enzima inactiva los peróxidos lipídicos procedentes del ataque de los RLO sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas y los productos derivados de la acción de la lipoxigenasa. Pero también actúa mediante la reducción del peróxido de hidrógeno, evitando la formación de radicales hidroxilo y manteniendo reducidos los grupos sulfhidrilos de las proteínas.

Existen dos tipos de GPx: GPx selenio dependiente y GPx no selenio dependiente.

- La GPx selenio dependiente cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos orgánicos
- La GPx no selenio dependiente sólo tiene actividad frente a hidroperóxidos orgánicos.

La enzima glutatión reductasa (GR) es la enzima que cierra el ciclo y su distribución celular va ligada a la de la GPx. El glutatión oxidado (GSSG) procedente de la actividad GPx, es citotóxico, por lo que ha de eliminarse de las células. Existe dos mecanismos fundamentales para su eliminación: su transporte fuera de la célula (a diferencia del GSH) o su conversión a GSH mediante la enzima GR. Así pues, la GR se encarga de regenerar el GSH necesario, en presencia de NADPH.



**Figura 3: Representación esquemática del ciclo del glutatión**

Las mitocondrias producen continuamente especies reactivas de oxígeno y no contienen catalasa, aunque no se excluye la participación de otros antioxidantes, parece ser que el GSH es un antioxidante que utilizan las mitocondrias para protegerse del daño oxidativo (23). En 1985, Griffith y Meister (24) descubrieron que el GSH que existe en la mitocondria procede del citosol celular. El GSH es necesario para la función mitocondrial normal ya que cuando “in vivo” se induce una deficiencia de GSH administrando butionina sulfoximina (BSO), se produce una degeneración mitocondrial. Por tanto, el GSH es el antioxidante principal que utilizan las mitocondrias para contrarrestar los RLO que producen constantemente y prevenir así el daño oxidativo.

Otras funciones fisiológicas del GSH son: detoxificación de xenobióticos, prevención de la formación de cataratas, protección contra las radiaciones, regulación de la proteólisis, reservorio de cisteína, ahorro de metionina, regulación de la gluconeogénesis, regulación de la vía de las pentosas fosfato, mantenimiento del estatus tiólico en la membrana celular, formación de enlaces disulfuro en las proteínas, participación en la captación de aminoácidos del ciclo  $\gamma$ -glutamilo, etc.

#### 1.1.4.2 Sistemas no enzimáticos

Son protectores no enzimáticos que previenen las reacciones en cadena de los RLO cuando hay un exceso de producción de estos. Incluyen la vitamina E, la vitamina C, ácido úrico, la bilirrubina y la albumina (25).

##### A) Proteínas quelantes de hierro.

En condiciones fisiológicas, el hierro no está disponible para la síntesis de radical hidroxilo mediante la reacción de Haber-Weiss, sino que en su mayoría está unido a la ferritina. Pero en condiciones de isquemia, con la muerte celular, se libera hierro que sí contribuye a generar hidroxilo. Además, la producción de radical superóxido aumenta la disponibilidad de hierro al actuar sobre la *ferritina*. Existen proteínas en el medio extracelular que al unirse al hierro y por tanto, disminuir su disponibilidad, se consideran antioxidantes. Algunas son transportadoras de hierro como la *transferrina* y la *lactoferrina*. Otras, como la ceruloplasmina cataliza el paso de hierro ferroso a férrico, que se une después a la transferrina. La *albúmina* se une débilmente al hierro, pero tiene gran afinidad por el radical hidroxilo.

##### B) Vitaminas

La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), actúa en la membrana celular. Reacciona con los radicales superóxido, hidroxilo y peroxil para formar especies menos reactivas. Se ha descrito un papel protector de la vitamina E en procesos como cáncer, envejecimiento, artritis, ejercicio intenso y en enfermedades cardiovasculares (26).

Los beta-carotenos, precursores de la vitamina A, se acumulan en las membranas de ciertos tejidos. Su acción es similar al de la vitamina E, aunque menos potente.

La vitamina C o ácido ascórbico, se considera antioxidante porque en condiciones de baja concentración de hierro, se une al radical superóxido o hidroxilo. Sin embargo,

cuando hay una alta concentración tisular de hierro, el ácido ascórbico es capaz de catalizar la reacción de Fenton, que a su vez facilita la producción del radical hidroxilo.

### C) Ácido úrico

Formado en el catabolismo de las purinas, el ácido úrico elimina directamente el radical hidroxilo, oxígeno singlete, y radicales peroxil procedentes de la peroxidación lipídica. Además, previene la oxidación de la vitamina C.

### D) Ubiquinona

Ejerce de transportador en la cadena respiratoria mitocondrial, pudiendo inhibir la síntesis de radicales alquilo y peroxilo.

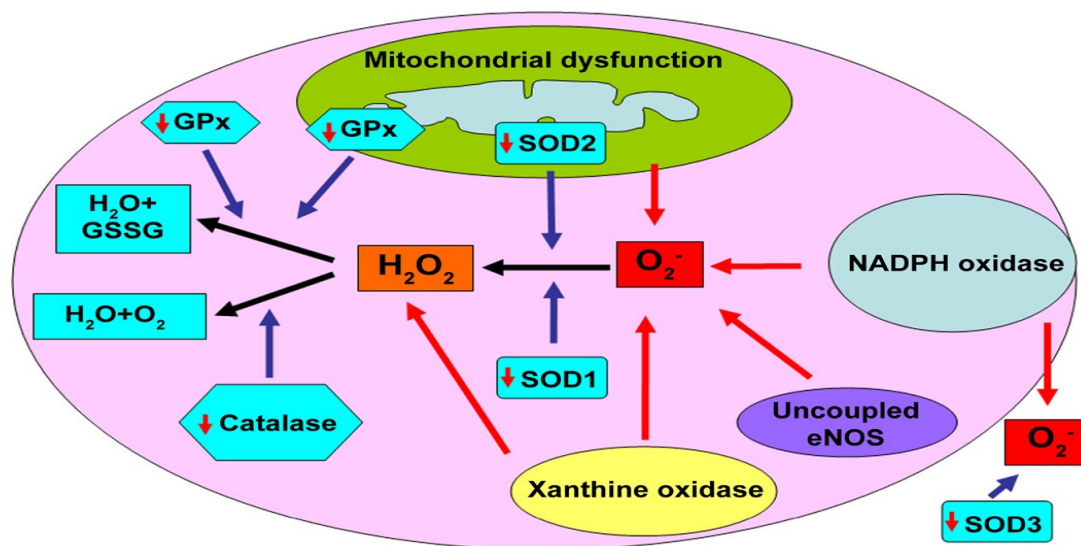


Figura 4: Esquema de los principales mecanismos antioxidantes celulares (27)

### 1.1.5 ESTRÉS OXIDATIVO

***LA PARADOJA DEL OXÍGENO (28). La vida sobre la tierra ha evolucionado dando lugar a organismos aeróbicos, que no pueden sobrevivir sin oxígeno, que es clave para sus procesos metabólicos. Sin embargo, cuando este oxígeno es activado se convierte en tóxico para estos organismos. El exceso de formas activas de oxígeno conduce al llamado estrés oxidativo***

Gersman et al. describieron por primera vez, en 1954 que la toxicidad del oxígeno se debía a la formación de radicales libres. Unos años mas tarde, cuando McCord y Friovich propusieron que la formación de radicales libres era una parte integral del metabolismo de la célula y por ello encontraron muchas reticencias en la comunidad científica. Actualmente ya no existe duda de la participación de las especies reactivas del oxígeno en numerosos procesos fisiológicos y patológicos.

Como se ha avanzado anteriormente, se define el estrés oxidativo como una alteración del equilibrio entre los agentes prooxidantes y los antioxidantes, a favor de los primeros (7). El desequilibrio puede deberse a un exceso de especies oxidantes, un déficit de antioxidantes o por ambos a la vez. Como consecuencia de este disbalance, se produce el daño oxidativo.

Más recientemente, se ha redefinido el concepto de estrés oxidativo como un desequilibrio que se produce entre los sistemas redox capaces de generar RLO y el control de éstos mediante los diferenres mecanismos capaces de controlar la producción y la eliminación de los RLO (29).

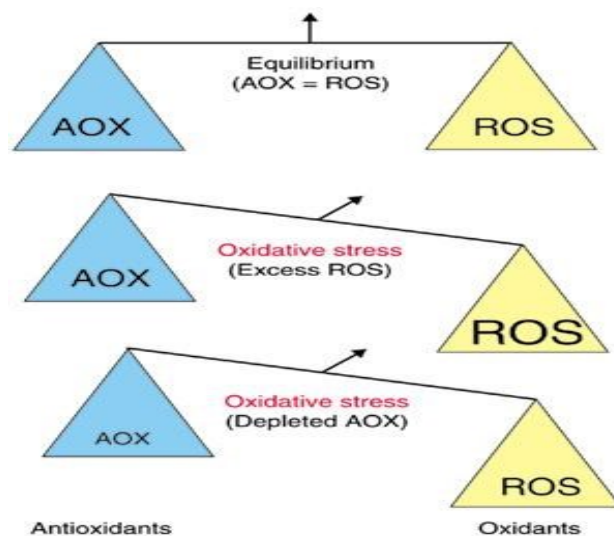


Figura 5: Disbalance entre los RLO y los mecanismos antioxidantes. (30)

### 1.1.5.1 Estrés oxidativo y daño a biomoléculas

#### A. Daño oxidativo a lípidos

Los ácidos grasos poliinsaturados son las biomoléculas más susceptibles a ser dañadas por los radicales libres. El ataque oxidativo de los radicales libres a los lípidos se conoce como peroxidación lipídica (31, 32).

Los radicales iniciadores de esta reacción son, el radical hidroxilo, el peróxido, el alcóxido y el alquílico. Los productos finales de este proceso de peroxidación lipídica son aldehídos, gases hidrocarbonatos y varios residuos químicos. El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de este proceso de oxidación (32, 33). Estos subproductos pueden alterar la actividad de fosfolipasas e inducir la liberación de ácido araquidónico, con la consiguiente formación de prostaglandinas y endoperóxidos. La reacción que se produce es una reacción en cadena, en la que el estímulo detonante inicial se amplifica, formándose multitud de especies reactivas activadas. De esta manera, se produce la oxidación de una gran cantidad de moléculas.

## **B. Daño oxidativo a proteínas**

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, principalmente por el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína, y por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica. Así pues, el efecto de los RLO sobre una determinada proteína depende de su composición en aminoácidos, de la importancia y localización de los éstos (34).

## **C. Daño oxidativo al ADN**

El ADN también es susceptible de daño oxidativo en todos sus componentes. Son sobre todo los radicales hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) y superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) los responsables principales de las alteraciones oxidativas en las bases del DNA. Las alteraciones que con más frecuencia se observan en el DNA en condiciones de estrés oxidativo son un incremento en sus niveles de fragmentación y modificaciones oxidativas en las bases púricas y pirimidínicas. El oxígeno también se puede adicionar al azúcar y generar un radical peroxil. Se producen alteraciones en la duplicación y la transcripción que explican la asociación entre la generación de RLO con la carcinogénesis y el envejecimiento (35).

### **1.1.5.2 Indicadores de estrés oxidativo**

Se han identificado múltiples marcadores que permiten detectar y cuantificar el daño oxidativo. Se resumen en la siguiente tabla, en función de su origen.

<b>OXIDANTES</b>	<b>ANTIOXIDANTES</b>
Anión superóxido	Glutathion
Radical hidroxyl	Ascorbato
Peróxido de hidrógeno	Alfa-tocoferol
Peroxinitrito	Capacidad antioxidante total
Otros	
<b>PRODUCTOS DE LA OXIDACIÓN</b>	<b>BALANCE ANTI/PROOXIDANTE</b>
Grupos carbonilo de proteínas	GSsG/GSH ratio
2-oxohistidina	Estado redox de cistina
Isoprostanos	Estado thiol/disulfide
Malondialdeido	
El 4-hidroxinonenal	
Etano y pentano	
Nitratos/nitritos	
Nitrotirosina	
8-OH-dG	

**Tabla 1: Indicadores de estrés oxidativo**

Entre ellos destacan: el cociente glutatión oxidado/reducido (GSSG/GSH) como indicador del estado redox de las células y por tanto el daño oxidativo al citosol; el malondialdeído (MDA), pentanos, etanos e isoprostanos (como p.e. el 8-isoprostano) como marcadores de daño oxidativo a lípidos; grupos carbonilo y 2-oxohistidina para evaluar los niveles de daño a proteínas y 8-hidroxi-2´desoxiguanosina como índice del daño oxidativo en el ADN.



## **A) Indicadores de daño oxidativo en el citosol**

### **Cociente GSSG/GSH**

El glutatión desempeña diferentes funciones relacionadas con la protección antioxidante de las células (36) a través de su grupo activo, el sulfhidrilo del residuo de cisteína. Cuando dos moléculas de GSH se oxidan, ceden un electrón cada una, dan lugar a la forma disulfuro (GSSG). El GSSG es, por tanto, un indicador característico de estrés oxidativo. El aumento de la concentración de glutatión oxidado altera el estado redox del glutatión, aumentando el cociente GSSG/GSH total.

En condiciones fisiológicas, los niveles de GSH son mucho mayores que los de GSSG pero una pequeña oxidación del GSH supone un aumento muy importante del GSSG por la facilidad de oxidación del GSH, a pH neutro. Estas condiciones dificultan la correcta determinación de GSSG. Este inconveniente ha sido resuelto por Asensi et al. (37), al proponer el bloqueo del grupo tiol con N-etilmaleimida inmediatamente después de la extracción y el posterior análisis de GSSG por cromatografía líquida.

## **B) Indicadores de daño oxidativo a proteínas**

### **Grupos carbonilo en proteínas**

La espectrofotometría es el método para la detección de los grupos carbonilo más empleado. Se basa en la reactividad de la 2,4-dinitrofenilhidrazina con los grupos carbonilo para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona (38). Otro método empleado para la detección de los grupos carbonilo es el marcaje con borohidruro de sodio tritiado.

### **2-oxohistidin**

La oxidación del grupo imidazol de la histidina (un aminoácido muy vulnerable al estrés oxidativo) da lugar a la formación de 2-oxohistidina que se ha empleado como indicador del daño oxidativo a las proteínas (39).

### **C) Indicadores de daño oxidativo a lípidos**

#### **Malondialdehído y 4-Hidroxineoneal**

Los indicadores clásicos de daño oxidativo a lípidos son el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal. La determinación de MDA se basa en que la degradación de los lipoperóxidos da lugar a la formación de diversos aldehídos. Se han descrito varios métodos para la determinación de malondialdehído (40), pero la mayoría son poco específicos, ya que utilizan el ácido tiobarbitúrico como reactivo y éste reacciona con todos los aldehídos. La cromatografía líquida de alta resolución (HPCL) ha permitido mejorar este inconveniente gracias a la separación, por del adducto malondialdehído-ácido tiobarbitúrico de otras sustancias que puedan interferir en la determinación. Cabe destacar que el MDA no es un producto específico de la lipoperoxidación y que existen otros marcadores con mayor sensibilidad y especificidad, como los isoprostanos, que aportan ventajas en la detección del estrés oxidativo (41).

Las técnicas convencionales de cuantificación El 4-hidroxinonenal, un producto de la peroxidación lipídica, incluyen la derivatización de la muestra con dinitrofenilhidracina para formar un adducto estable y no volátil con el aldehído. Luego se separa y cuantifica el pico del 4-hidroxinonenal con una cromatografía por HPCL.

#### **Pentano y etano**

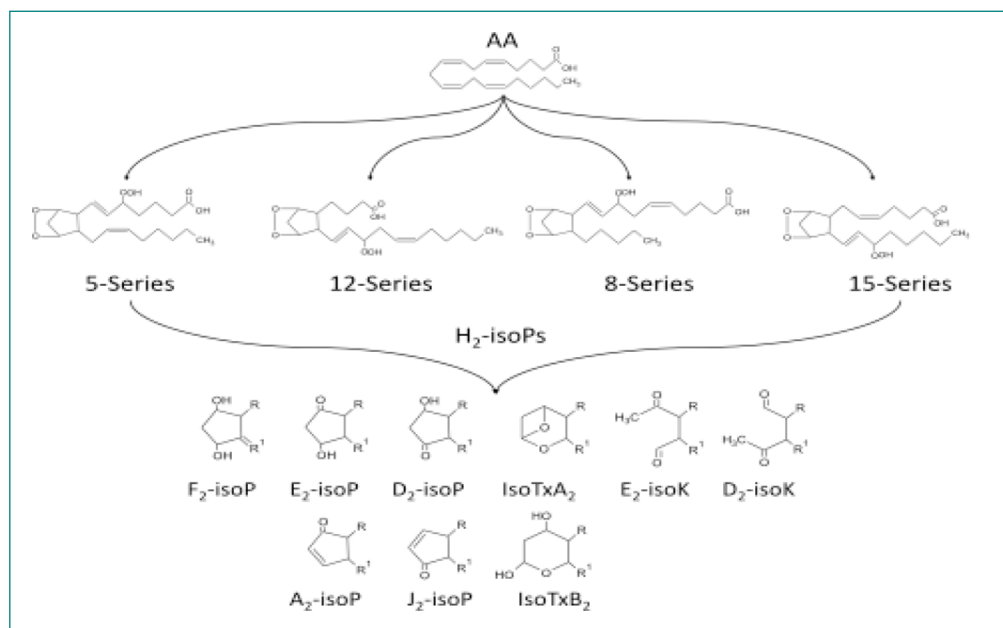
El etano y el pentano son dos hidrocarburos de cadena corta que se forman como productos terminales durante la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados  $\Omega$ -3

y  $\Omega$ -6. Como son volátiles se eliminan por vía pulmonar y se pueden cuantificar mediante la cromatografía de gases. La técnica es no invasiva y por su fácil aplicación se ha empleado mucho en seres humanos como índice de peroxidación lipídica (42).

### **Isoprostanos**

Los isoprostanos fueron descubiertos en 1990 por Morrow y Roberts. Son unos compuestos similares a las prostaglandinas que se forman abundantemente *in vivo* por la peroxidación del ácido araquidónico inducida por radicales libres, independientemente de la enzima ciclooxigenasa (COX) (43). Tienen actividad biológica específica (44) al alterar la función de la membrana celular y pueden actuar como mediadores en los efectos celulares del daño oxidativo.

Los isoprostanos como el 8-isoprostano (8-isoPGF<sub>2</sub>) se generan tanto a partir de moléculas libres de ácido araquidónico como a partir de la esterificación de los lípidos de membrana (45, 46). Los radicales libres de oxígeno son los responsables de la formación de los isoprostanos, mediante la sustracción de un átomo de hidrógeno del ácido araquidónico, originando la formación de cuatro isómeros de la PGH<sub>2</sub>. Cada uno de estos cuatro isómeros, puede ser completamente reducido, dando lugar a cuatro isómeros diferentes de la PGF<sub>2</sub> o parcialmente reducido, dando lugar a isómeros de la PGE<sub>2</sub> o PGD<sub>2</sub>. De esta manera se forman 64 compuestos diferentes conocidos colectivamente como F<sub>2</sub> isoprostanos por su similitud estructural con la prostaglandina F<sub>2</sub>-alfa derivada de la ciclooxigenasa.



**Figura 6: Productos de la lipoperoxidación del ácido araquidónico inducida por RLO.**

Reproducida de Janicka et al(47)

La diferencia fundamental a nivel estructural entre isoprostanos y prostaglandinas, radica en la cadena lateral unida al anillo prostano. Los isoprostanos tienen orientación *cis* (45, 48), mientras que las prostaglandinas poseen exclusivamente cadenas en posición *trans*. Por esta configuración, para los primeros isoprostanos se adoptó una nomenclatura similar a la de las prostaglandinas, por ejemplo como 8-*iso* PG u 8-*epi* PG. Como esta nomenclatura no permite la diferenciación de las numerosas estructuras isoméricas, Taber (48) y Rokach (49) propusieron dos nomenclaturas más completas para los isoprostanos.

En cuanto a la concentración tisular, los F<sub>2</sub>-isoprostanos son los más abundantes. Se encuentran en cantidades cuatro veces superiores que los D<sub>2</sub>/E<sub>2</sub>-isoprostanos e isotromboxanos (50). Actualmente los isoprostanos son considerados los mejores índices disponibles de lesión por radicales libres (41). Son productos secundarios de la peroxidación lipídica, cuantificables y de gran estabilidad química. Se pueden medir en orina (51), plasma (52), líquido céfalo-raquídeo (53), condensado del aire exhalado (54), lavado broncoalveolar (55) o de forma esterificada en membranas tisulares o en partículas lipídicas circulantes (52). Asimismo, la cuantificación de los isoprostanos ha sido propuesta como marcador pronóstico en determinadas patologías como el fallo

cardiaco (56), la hipertensión pulmonar (57), y también como herramienta para evaluar la terapia antioxidante (58). El hallazgo de niveles significativos de isoprostanos en tejidos y fluidos biológicos de animales y humanos sin patología, indica que existe peroxidación lipídica y que ésta se suprime de forma incompleta por las defensas antioxidantes. Hasta la fecha, la mayoría de los datos sobre las concentraciones de estos marcadores y sus variaciones en condiciones fisiológicas se limitan al 8-*iso* PGF<sub>2</sub>, también denominado 8-isoprostano.

No está del todo aclarada la variación de la concentración de isoprostanos con la edad y el sexo. Algunos trabajos defienden que los niveles plasmáticos de isoprostanos no varían con la edad, sin embargo, en varios estudios se han documentado, en ratas, concentraciones plasmáticas de F<sub>2</sub> isoprostanos y los niveles de F<sub>2</sub> isoprostanos esterificados en lípidos, relacionadas con la edad avanzada (59). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el proceso normal de envejecimiento se debe, en parte, al aumento del daño oxidativo de las moléculas biológicas. Las concentraciones urinarias de isoprostanos no parecen modificarse con el ritmo circadiano ni con el contenido lipídico de la dieta (60).

Se han publicado niveles elevados de isoprostanos en diversas entidades neurológicas como en la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington, y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (53). Aumentan igualmente en patologías como el asma, la hipertensión pulmonar (57), la diabetes mellitus, la insuficiencia renal crónica, y la coronariopatía etc. La concentración urinaria de la 8-*iso* PGF<sub>2</sub> parece aumentar en pacientes con factores de riesgo cardiovascular tales como la aterosclerosis, el tabaquismo (61), la diabetes (62), la hipercolesterolemia (61) y la hiperhomocistinemia. En algunas de estas enfermedades, se ha encontrado una relación entre la mejoría clínica y la reducción de los niveles de isoprostanos. Esto se interpreta como una prueba de la participación del estrés oxidativo en la fisiopatología de estas enfermedades. Hasta el momento, sin embargo, resulta difícil establecer un papel real de los isoprostanos que vaya más allá del reflejo de la situación de estrés.

Los F2-isoprostanos pueden ser cuantificados como compuestos libres en los fluidos biológicos *in vivo*. Para medir la concentración de F2 isoprostanos esterificados a los fosfolípidos, éstos se deben extraer primero del tejido y a continuación, liberar los F2-isoprostanos mediante hidrólisis alcalina (63).

Los métodos cromatográficos son el “patrón oro” para la cuantificación de los isoprostanos pero son costosos e implican gran dificultad técnica, por lo que resultan difícilmente aplicables como métodos de rutina (63). Es por ello que se han desarrollado también técnicas de inmunoensayo que han demostrado ser más simples y rápidas para la detección de isoprostanos.

### **Indicadores de daño oxidativo al ADN**

#### **8-oxo-desoxiguanosina**

La 8-hidroxiguanina es una base modificada que aumenta con el estrés oxidativo(64). Puede ser eliminada por una glicosilasa que elimina la base nitrogenada (8-hidroxiguanina) o por una endonucleasa que elimina el nucleósido (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina). Ambas se eliminan por la orina.

La cantidad del nucleósido 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina en órganos o en orina se utiliza como índice del daño oxidativo al ADN “*in vivo*”. Se prefiere la detección del nucleósido, porque la excreción de la base oxidada en orina está muy influenciada por la ingesta.

### 1.1.5.3 Indicadores de estrés nitrosativo

#### Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) / Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )

Tanto los nitritos como los nitratos son metabolitos estables resultantes de la oxidación del óxido nítrico, cuya vida media es muy corta. La suma de ambos metabolitos es útil para medir de forma indirecta la producción de óxido nítrico. Pueden determinarse tanto en plasma y en orina. Más recientemente, se han publicado trabajos que cuantifican nitratos/nitritos en CAE.

De las distintas técnicas descritas para la detección de estos metabolitos, la detección colorimétrica con reactivos de Griess es la más utilizada. Para poder medir los nitratos mediante la reacción de Griess, deben ser previamente reducidos a nitritos por la nitrato reductasa. La reacción de Griess involucra la formación de un cromóforo mediante la diazoción de la sulfanilamida con ácido nitroso, seguido de la unión con una amina bicíclica. Esta técnica ha demostrado ser una alternativa viable y rentable para la cuantificación de los metabolitos estables de óxido nítrico.

#### 3-Nitrotirosina

El radical  $\text{O}_2^-$  oxida la molécula de  $\text{NO}\cdot$  generando peroxinitritos, que son los responsables de la nitración de residuos tirosínicos de las proteínas. La nitración mediada por los peroxinitritos *in vivo* podría ser inhibida por un exceso de producción relativa de  $\text{O}_2^-$ , debido a la competencia entre éste y el  $\text{NO}\cdot$  por el radical tirosilo, por lo que la formación de 3-nitrotirosina sería inhibida cuando la tasa de formación de  $\text{O}_2^-$  superara la de  $\text{NO}\cdot$ . La medición de la masa de nitrotirosina plasmática por *western blot* es considerada una medida indirecta de la biodisponibilidad del  $\text{NO}\cdot$ .

## 1.2. Fenómeno de Isquemia- Reperusión

Cuando un órgano se ve privado de flujo sanguíneo, la restauración del mismo es imprescindible para prevenir la necrosis y disfunción de dicho órgano. Sin embargo, sorprendentemente, la reperusión tisular aumenta el daño que hubiera podido producir la isquemia *per se*. Este fenómeno se conoce como daño celular por isquemia-reperusión (IR).

Isquemia y reperusión se suceden en multitud de procesos:

- fisiológicos, como el envejecimiento y el ejercicio intenso
- patológicos: cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular, carcinogénesis
- numerosos tipos de cirugía: trasplante de órganos, cirugía vascular, cirugía pulmonar o cirugía en la que se aplica un torniquete.

El mecanismo de isquemia-reperusión es multifactorial, implicando varios mecanismos biológicos a nivel humoral, celular y vascular así como la expresión de genes de productos proinflamatorios (citokinas) y la formación de especies reactivas de oxígeno. Los radicales libres son responsables directos del daño celular a través de la oxidación de biomoléculas, fundamentalmente la peroxidación de lípidos de membrana.

**La isquemia** resulta en daño celular directo por la privación de oxígeno y la consecuente activación de enzimas citotóxicas, que llevan a la muerte celular.

El proceso de fosforilación oxidativa no tiene lugar en la mitocondria durante la privación de oxígeno, de manera que la energía ha de proceder de la glicolisis anaerobia, que no es suficiente para restaurar el ATP (adenosin trifosfato) necesario para las funciones celulares.

Este déficit de ATP afecta al transporte de iones a través de la membrana celular, con aumento resultante de sodio y agua intracelulares, y el consiguiente edema. Este desbalance iónico también sucede en los orgánulos conduciendo al edema y desintegración de la mitocondria, así como a la formación de vesículas en el retículo



endoplásmico. La ruptura de los lisosomas y la salida de los enzimas que contienen, representan el paso previo a la muerte celular (65).

El daño por **reperfusión** está directamente relacionado con la formación y liberación de radicales libres de oxígeno, daño de la célula endotelial, aumento de la permeabilidad vascular, y la activación de neutrófilos, plaquetas, citocinas y el sistema del complemento. La hipoperfusión provoca además un desbalance entre los agentes vasodilatadores y los vasoconstrictores. El endotelio hipóxico aumenta la producción de potentes vasoconstrictores como endotelina tipo 1, 2 y 3 y disminuye la producción de vasodilatadores como el óxido nítrico. Estos cambios, particularmente los que afectan a la célula endotelial, iniciados durante el periodo de isquemia, no sólo son responsables de daño celular, sino que propician las condiciones favorables para un daño mayor durante el periodo de reperfusión (66). En la superficie endotelial se observan receptores para las interleucinas y el complemento, mediadores que participan en el desarrollo de la lesión por IR.

Por otra parte, el óxido nítrico junto con factores quimiotácticos y citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1) promueven el reclutamiento de polimorfonucleares al sitio de reperfusión y la adherencia al endotelio disfuncional.

#### DURANTE LA ISQUEMIA

Caída energética o disminución de la fosforilación oxidativa

Formación de radicales libres

Aumento del calcio intracelular

Activación enzimática

Incremento de la permeabilidad celular.

### DURANTE LA REPERFUSIÓN

Conversión de la xantina oxidasa en xantina deshidrogenasa.

Gran incremento en la producción de RLO.

Alteración en el transporte epitelial del hierro.

Inducción de la NOS, con la consiguiente producción de RLN

Disminución de la actividad Gpx y de las demás enzimas antioxidantes.

Alteración del endotelio vascular. Activación plaquetaria

Activación del complemento. Activación de los neutrófilos y síntesis de IL

Apoptosis-necrosis

**Tabla 2. Resumen de los mecanismos implicados en el daño por isquemia-reperfusión**

#### 1.2.1 RELACION ENTRE ISQUEMIA REPERFUSIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO

Como se ha visto, son muchos los factores implicados en el daño tisular por IR y los RLO juegan un papel destacado en el proceso. Como se resume en la figura 7, en condiciones normales, al menos el 2-3% del oxígeno se reduce a agua por la cadena respiratoria mitocondrial. El anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se producen normalmente, activando genes que codifican proteínas protectoras frente al estrés oxidativo y sirviendo de señal en el fenómeno de precondicionamiento. En

condiciones de isquemia-reperfusión, el balance normal se pierde y se producen radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) vía reacción de Fenton.

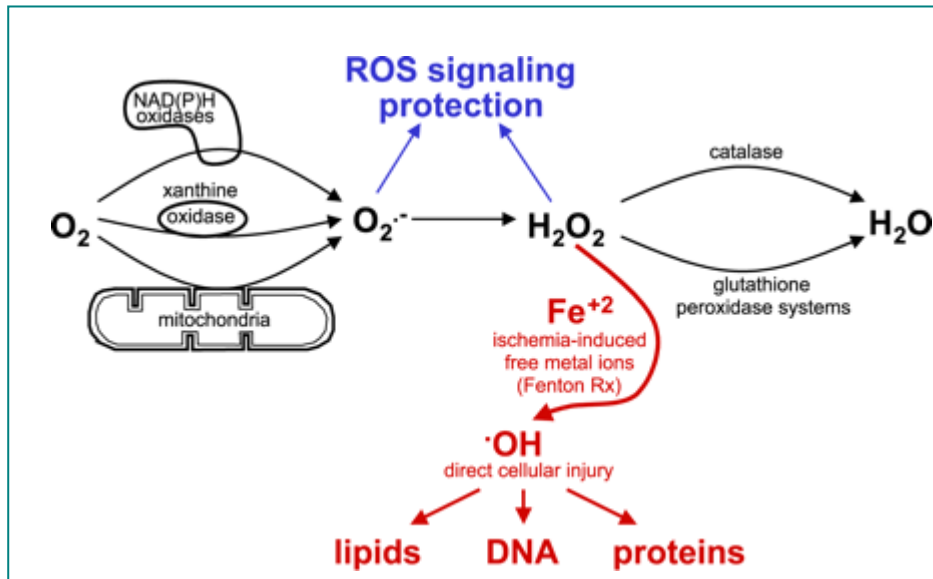


Figura 7: Metabolismo del Oxígeno durante la IR. (67)

Durante la fase de **isquemia**, con la disminución de ATP o “caída energética” se pierde el gradiente transmembrana de Na y K y el de calcio del retículo sarcoplásmico. Al elevarse el calcio citosólico ( $\text{Ca}^{++}$ ) se activan diferentes sistemas enzimáticos y receptores de  $\text{Ca}^{++}$ . Una de las proteasas Ca-dependientes activadas, conduce a la conversión de Xantina Deshidrogenasa (XDH) a Xantina Oxidasa (XO), en presencia de NADPH.

La XDH se convierte a XO, en un primer momento de forma reversible (esta conversión va precedida de una disminución de glutatión) y secuencialmente, de forma irreversible, por acción proteolítica. De esta manera, en condiciones de hipoxia, el ATP es degradado a AMP, adenosina, hipoxantina, xantina y urato. La oxidación de hipoxantina por la XO a xantina y ácido úrico genera 2 radicales superóxido.

La XO es la mayor fuente biológica de producción de superóxidos en tejidos post-isquémicos. Estudios de IR en cirugía de miembro inferior de pacientes, muestran que se produce un aumento de XO en los tejidos del miembro inferior y en la circulación sistémica (68).

Aunque la mayor producción de RLO se producen durante la reperfusión, algunos grupos han documentado la formación de radical superóxido también en el periodo de isquemia. Puede parecer paradójico que en condiciones de hipoxia se produzcan RLO, pero hasta con un 90% de disminución del aporte de oxígeno al corazón se ha visto que hay cantidades considerables de O<sub>2</sub> molecular. Durante la isquemia, la cadena respiratoria mitocondrial, pasa a un estado reducido, lo cual supone la transferencia de electrones al oxígeno molecular, generándose grandes cantidades de radical superóxido (67), especialmente en los complejos I y III (69, 70). La generación de RLO durante la isquemia es un hecho de gran interés, ya que se ha visto que estos radicales podrían tener un papel como moléculas de señalización en la génesis del daño oxidativo (71). Además, es probable que esta fuente de RLO sea un detonante en el fenómeno del preconditionamiento isquémico (72).

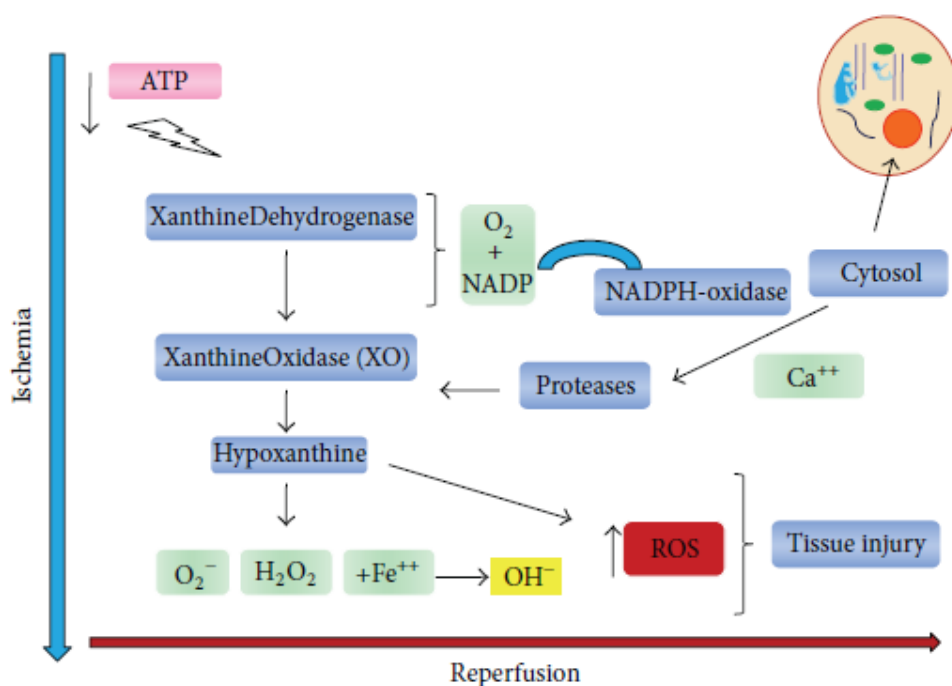


Figura 8: Formación de RLO durante la isquemia-reperfusión pulmonar (73)

Como se muestra en la figura 8, durante la fase de isquemia se produce la conversión de XDH a XO, pero ésta, precisa el oxígeno molecular en lugar de NAD<sup>+</sup> para producir el radical superóxido. Es decir, la formación de RLO por la XO tiene lugar preferentemente durante el periodo de reperfusión. Durante la fase de **reperfusión** los radicales liberados

producen la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y de los fosfolípidos de membrana. El daño de la membrana celular puede afectar a su integridad o a la de organelas como mitocondrias y lisosomas.

Además se liberan sustancias que atraen, activan y promueven la adherencia de polimorfonucleares al endotelio vascular, aumentando la lesión. A su vez, los polimorfonucleares pueden producir más radicales libres, con lo que el daño se mantiene.

### **1.2.2 LESIÓN PULMONAR POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN**

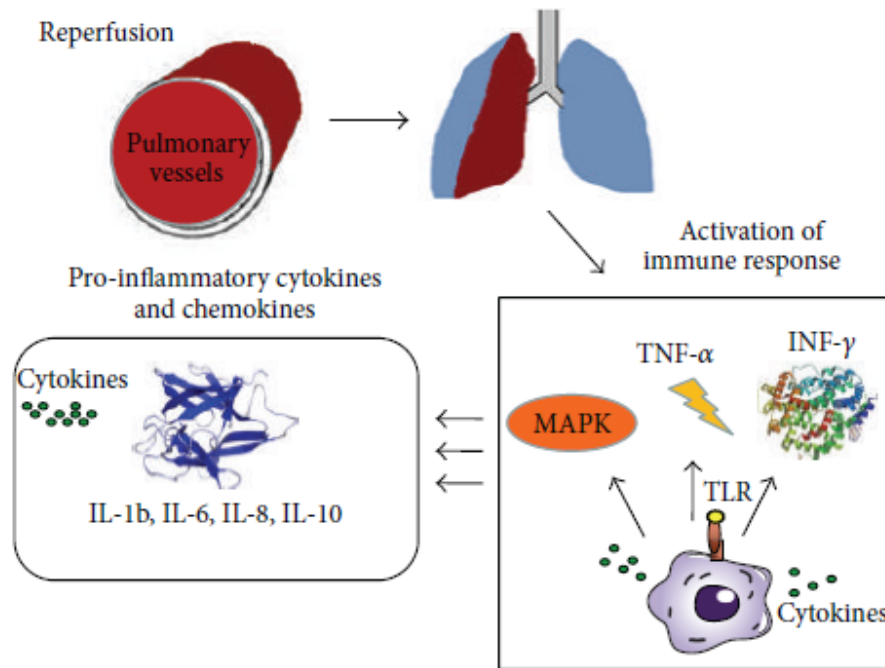
Cada órgano o tejido tiene diferentes grados de tolerancia a la pérdida total o parcial de su flujo sanguíneo. En situaciones patológicas donde disminuye de forma aguda o crónica la perfusión sanguínea de los órganos, aparecen lesiones no sólo en el órgano diana sino también a nivel sistémico. Además como se ha visto, la reperfusión aunque es necesaria provoca paradójicamente lesión tisular.

El mecanismo de lesión por IR en el párenquima pulmonar es similar al que se produce en otros órganos y supone un papel central para los radicales libres de oxígeno. La lesión pulmonar por IR puede producirse por traumatismos, aterosclerosis, embolismo pulmonar o procedimientos quirúrgicos. Entre los últimos, el mejor estudiado es el modelo de trasplante pulmonar, por las implicaciones de la IR en la viabilidad del injerto y la mortalidad en el postoperatorio inmediato (74-76).

El fenómeno de IR puede tener lugar en multitud de órganos como el corazón, hígado, riñones, o sistema nervioso central. En todos ellos, la isquemia se traduce hipoxia tisular hasta la llegada de oxígeno mediante la reperfusión. Sin embargo, el pulmón puede sufrir isquemia sin hipoxia tisular puesto que el oxígeno alveolar contribuye a mantener en parte el metabolismo aeróbico (77). A pesar de esta aparente mejor resistencia a la hipoxia, el daño oxidativo pulmonar por IR se ha documentado en distintas situaciones como el trasplante o el neumotórax (74, 78, 79). Es más, se ha descrito cambios inducidos por la hipoxia en relación con situaciones de hipoperfusión, como la generada por la VPH.

Algunos de los agentes implicados en la lesión pulmonar por isquemia-reperfusión son el TNF- $\alpha$ , los metabolitos del NO, y el aumento de permeabilidad de la microcirculación pulmonar, que conduce al edema pulmonar (80). En la fase temprana de la IR pulmonar, se ha descrito la activación de las células endoteliales y las plaquetas, con la consiguiente adhesión plaquetar a la pared arteriolar y la liberación de sustancias vasoactivas, mediada por los radicales libres de Nitrógeno (RLN)(81). Los mediadores que se liberan durante la reperfusión, al pasar al torrente sanguíneo son capaces de activar células endoteliales en otros órganos, distintos al expuesto al daño isquémico.

Durante el periodo de reperfusión existe también una respuesta autoinmune (79) que promueve la activación del complemento, de los receptores toll-like (TLR) y la migración de las células inflamatorias al órgano isquémico. Los TLR reconocen moléculas específicas, que sirven de *trigger* para distintas vías, como la de la protein cinasa (MAPK) y la del interferón tipo I. Estas señales resultan en la producción de citoquinas proinflamatorias. Para activar estos receptores, se ha demostrado que no es necesario un estímulo microbiano, sino que es posible en el contexto de daño o muerte celular, como sucede con la IR (82).



**Figura 9: Activación de los mecanismos inflamatorios durante la reperusión (73)**

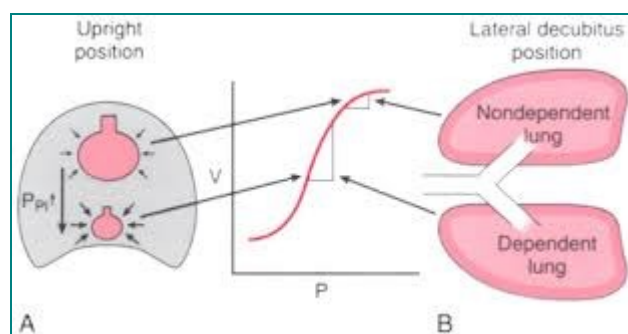
### 1.3 Particularidades de la Cirugía de lobectomía pulmonar.

Una de las características diferenciales de la cirugía torácica es la necesidad de colapso del pulmón que ha de ser intervenido. La posición de decúbito lateral y apertura torácica al aire y colapso del pulmón a intervenir permite la mejor exposición del pulmón y facilita la labor del cirujano. Por tanto, para asegurar una adecuada oxigenación y ventilación debe ventilarse un solo pulmón, el pulmón declive (o pulmón dependiente). La ventilación unipulmonar (VUP) o ventilación pulmonar selectiva, el efecto de la anestesia general, la toracotomía y el colapso del pulmón operado, condicionan unos cambios en la relación V/P: ventilación (V) y perfusión (Q). Estos cambios han de tenerse en cuenta a la hora de valorar otras posibles variables con repercusión en el pulmón, tales como el preconditionamiento remoto.

### 1.3.1 RELACIÓN ENTRE VENTILACIÓN Y PERFUSIÓN (V/Q) EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS

#### Ventilación

En una persona despierta, en bipedestación y respirando espontáneamente, los alveolos apicales están más insuflados y son poco distensibles. Los alveolos basales, por el contrario, son muy distensibles pero están muy comprimidos. Esto se debe a que la presión transpulmonar, que es la diferencia entre presión alveolar (PA) y presión pleural (Ppl), es superior en las bases. Para una misma PA, los alveolos de las bases tienen una mayor distensibilidad o *compliance*. Como se observa en la figura, la máxima pendiente en la curva de presión/volumen, corresponde a los alveolos de la mitad inferior del pulmón



**Figura 10: Representación de la compliance regional alveolar en bipedestación y en decubito lateral (83)**

#### Perfusión

La perfusión pulmonar se ve influenciada por dos factores fundamentalmente, la gravedad y la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH). La presión de la arteria pulmonar (Ppa) en condiciones normales, es capaz de vencer la presión hidrostática vertical. Por efecto de la gravedad, esta presión disminuye progresivamente de forma ascendente (84).

Por otra parte, la circulación pulmonar es un sistema de baja presión que se ve influenciado además por la presión alveolar (PA). Así pues, la perfusión pulmonar

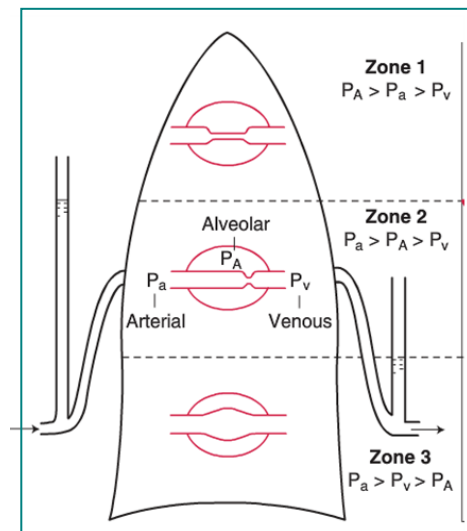


dependerá de los gradientes de presión generados entre la Ppa, la PA y la presión venosa pulmonar (Ppv). Esta diferencia en los gradientes de presión va a condicionar grandes diferencias de perfusión en el pulmón. Se distinguen tres zonas teóricas en función de la perfusión recibida, llamadas clásicamente zonas de West (85).

Zona 1. Corresponde a los vértices pulmonares. La PA es mayor que la Ppa y por tanto apenas hay perfusión. Es una zona de efecto espacio muerto.

Zona 2. Corresponde a la zona media. La Ppa es mayor que la PA y ésta a su vez, mayor que la Ppv. Es la que corresponde a la situación ideal

Zona 3. En las bases, la Ppa es mayor que la Pva y ésta mayor que la PA. Sería la zona de predominio del efecto shunt.



**Figura 11: Distribución de la perfusión pulmonar.** Reproducido de (85)

El otro gran fenómeno que modifica la perfusión pulmonar es la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH). Es un mecanismo de autorregulación mediante el cual, en zonas de hipoxia alveolar, se produce una vasoconstricción que permite la redistribución del flujo sanguíneo a otras áreas mejor ventiladas, de manera que se disminuye el shunt y mejora la oxigenación arterial.

Este mecanismo de regulación vascular cobra especial importancia durante la ventilación unipulmonar. Para que se produzca VPH es necesaria la integridad de la

musculatura lisa de los vasos pulmonares. Además, el fenómeno es efectivo para un determinado grado de hipoxia, entre el 30 y el 50% (84). Algunos fármacos, entre ellos agentes anestésicos, son capaces de anular la respuesta vascular de VPH en situaciones de hipoxemia. De entre los halogenados, el que inhibe la VPH en menor grado es el sevoflurano, de hecho, tendría un comportamiento similar al de propofol, medido en parámetros de oxigenación (86). Otros hipnóticos así como los mórnicos, no afectan la VPH, a excepción del óxido nitroso, que la reduce (84).

### **1.3.2 CAMBIOS EN LA RELACIÓN V/Q DURANTE LA LOBECTOMÍA PULMONAR**

Cuando un paciente está en decúbito lateral, bajo los efectos de la anestesia general, los relajantes musculares y en ventilación mecánica, es el pulmón proclive el que muestra una situación más favorable para la ventilación. Además, por la relajación diafragmática, las presiones aumentan sobre el pulmón declive, por la compresión de las vísceras abdominales y del mediastino, acentuando la pérdida de capacidad residual funcional (84).

Sin embargo, en la situación descrita, la perfusión será más favorable en el pulmón inferior o declive, con la consiguiente alteración de la relación V/Q (87). Si a esto se añade el colapso del pulmón proclive para facilitar la resección, se llega a la situación de máxima alteración de V/Q al estar el pulmón intervenido no ventilado, pero sí perfundido. Sin embargo el otro pulmón, no intervenido, está con una ventilación poco eficiente y bien perfundido. En esta situación, cobra importancia la VPH, que para minimizar el efecto shunt, desvía hasta el 50% del flujo del pulmón colapsado al pulmón declive, que sí está ventilado.

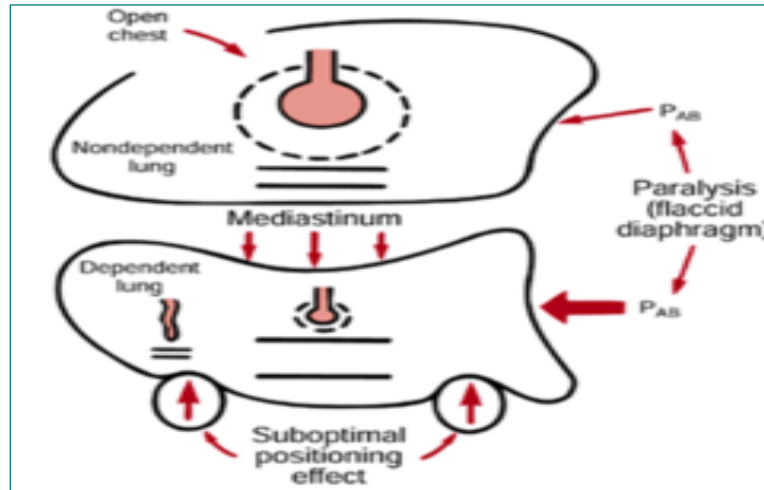


Fig 12: Esquema de cambios en V/Q , en paciente anestesiado, en decúbito lateral y tórax abierto. Modificado de (83)

### 1.3.3 MECANISMOS DE LESIÓN PULMONAR DURANTE LA CIRUGÍA DE RESECCIÓN.

Los pacientes sometidos a cirugía de lobectomía pulmonar tienen un riesgo aumentado de desarrollar ADRS. Durante el periodo de VPS el pulmón operado, está hipoperfundido como resultado del colapso así como por efecto de la VPH. Esta isquemia relativa, se sigue de reperfusión. Las RLO que se generan durante la IR, contribuyen a aumentar el daño pulmonar (78). La presencia de tejido neoplásico y la hiperoxia que a veces precisan estos pacientes durante la cirugía, podría contribuir asimismo a un aumento en la producción de RLO (54). Además, la estrategia ventilatoria, así como la fluidoterapia del procedimiento, pueden contribuir a aumentar el daño tisular.

### **A) Evidencias de lesión pulmonar por isquemia-reperfusión y estrés oxidativo**

En estudios con modelo animal, se objetiva que períodos cortos de isquemia seguidos de periodos de reperfusión, causan un daño mucho mayor que largos periodos de isquemia aislados, sin reperfusión posterior (65). Períodos prolongados de reperfusión se relacionan con un aumento de la actividad de la oxido nítrico sintetasa y de la expresión de NOS-rna (88). Así mismo, la administración de SOD, con efecto antioxidante, inmediatamente después de un periodo de reperfusión pulmonar en roedores, evita cambios en la permeabilidad vascular y un aumento consiguiente de RLO circulantes.

En modelo porcino, la isquemia-reperfusión, con la liberación de sustancias proinflamatorias que supone, conlleva una pérdida casi total del glicocalix de las células endoteliales. Este tipo de lesión provoca un aumento de la permeabilidad vascular y edema tisular (89, 90). En un principio, el daño pulmonar parece independiente de la activación y reclutamiento de neutrófilos. Además, en ratones modificados, sin neutrófilos, los periodos de IR muestran una producción de RLO similar a la de los controles, lo cual sugiere una fuente adicional de producción de RLO.

En cuanto a estudios en humanos, Williams et al (91), objetivaron que los pacientes sometidos a lobectomía pulmonar exhibían niveles mayores de daño pulmonar que aquellos a los que se realizaba una neumonectomía así como los que precisaban una resección menor (biopsia o resección en cuña). El daño oxidativo se medía en dicho estudio por la disminución plasmática de grupos tiol, que se precisan prevenir la oxidación de proteínas. Estos datos sugieren que el daño oxidativo se debe a IR puesto que acontece en aquellas situaciones en las que se precisa ventilación unipulmonar, con colapso y reexpansión del parénquima. Además, el hecho de que el daño pulmonar sea mayor en pacientes sometidos a lobectomía, en comparación con aquellos que precisan neumonectomía, sugiere que el daño persiste en el pulmón remanente.

Posteriormente, en un estudio piloto, se comprobó que los pacientes sometidos a cirugía de resección pulmonar (neumonectomía y lobectomía) tenían niveles aumentados de peróxido de hidrógeno en CAE así como de MDA (marcador de

lipoperoxidación lipídica) en orina (92). Además, los pacientes sometidos a lobectomía mostraban mayores niveles de daño que a los que se practicaba neumonectomía, en concordancia con los resultados de Williams et al. Estos hallazgos son más pronunciados en pacientes con cáncer, que parecen mostrar una mayor carga oxidante y una menor capacidad antioxidante (93).

Asimismo, se han detectado niveles aumentados de leucotrieno (LT) B<sub>4</sub>, que promueve el reclutamiento de neutrófilos y la liberación de enzimas lisosomales y RLO en CAE de pacientes sometidos a lobectomía pulmonar (94). En este mismo estudio, se objetivó un aumento de peróxido de hidrógeno así como una caída de pH en CAE en estos pacientes. Además, estos marcadores se modificaban en mayor medida que en los pacientes a los que se les practicaba cirugía de bypass coronario, lo que sugiere una implicación directa del daño por IR y la manipulación quirúrgica del parénquima pulmonar en la inflamación y el aumento de estrés oxidativo. La principal fuente de estrés oxidativo parece ser el pulmón colapsado y reperfundido (95).

Otro dato que refuerza el papel central de los RLO en la IR pulmonar es la relación que exhibe la duración VUP con el daño oxidativo. Tras una hora de VUP se incrementa hasta tres veces el daño oxidativo, con respecto a los valores basales (96). Esta relación entre el tiempo de colapso pulmonar y el grado de estrés oxidativo podría explicar la diferencia entre el daño pulmonar que se produce durante la lobectomía, respecto a las resecciones en cuña, normalmente menos laboriosas.

## **B) Tejido tumoral**

Otro factor que contribuye al daño pulmonar es la presencia de patología previa a nivel parenquimatoso. En concreto, la presencia de neoplasia pulmonar, como es el caso de los pacientes del presente estudio, es un factor adicional que favorece un estado oxidativo. Kaynar et al (97), estudiaron los principales mecanismos de defensa antioxidante (ciclo del glutatión, SOD, y catalasa) así como marcadores de estrés oxidativo (NO y MDA) en pacientes con carcinoma microcítico de pulmón y en pacientes con cáncer no microcítico, para compararlos con controles sanos. En dicho trabajo,

observaron una importante alteración de las defensas antioxidantes en los pacientes con cáncer, respecto a los controles. Esta alteración, conlleva además una mayor peroxidación lipídica medida a través de los niveles de MDA.

### **C) Daño pulmonar producido por la Ventilación mecánica**

El estrés físico y la hiperoxia inherentes a la ventilación mecánica, se ha relacionado en estudios tanto experimentales como clínicos con daño pulmonar. Se atribuye a la ventilación mecánica (VM) un efecto detonador de la activación inflamatoria y cambios en la barrera alveolo capilar en pacientes susceptibles, por enfermedad pulmonar de base o trauma y genéticamente predispuestos.

Se ha documentado daño pulmonar (inflamación neutrofílica, disrupción de la barrera alveolo-bronquial) en individuos con pulmones previamente sanos, sometidos a ventilación mecánica durante horas, tanto con bajo (4-8ml/kg) como con alto (10-15ml/kg) volumen corriente(98). En los pulmones sometidos a ventilación mecánica no sólo influye la VM *per se*, es determinante la estrategia ventilatoria utilizada y si se ventilan los dos o sólo un pulmón (VPS). Son numerosos los estudios, clínicos y experimentales que avalan la estrategia ventilatoria llamada “de protección pulmonar” para pacientes con ALI de cualquier causa. Dicha estrategia consiste fundamentalmente en volúmenes tidal bajos (menos de 7ml/kg), presión pico en la vía aérea limitada a 30, aplicación de PEEP y maniobras de reclutamiento.

Por el contrario, *volúmenes tidal (Vt)* altos (10-12 ml/kg) se han relacionado con sobredistensión pulmonar. En pacientes sometidos a toracotomía, que precisan VUP, Schilling et al. (99, 100), encontraron menores concentraciones alveolares de TNF- $\alpha$  así como de moléculas de adhesión (ICAMs) en pacientes ventilados con *volúmen tidal* bajo (5ml/kg), en comparación con pacientes ventilados con 10ml/kg de volumen corriente. Estos resultados sugieren que la ventilación mecánica agresiva agrava la respuesta inflamatoria. En este sentido, Michelet et al. (100) objetivaron un menor nivel de inflamación, medido con niveles plasmáticos de IL-6, así como menores valores de ELWI

(Índice de agua extravascular pulmonar) y mejoría en los parámetros de oxigenación, en pacientes sometidos a esofagectomía y ventilados con  $V_t$  de 5ml/kg y 5cmH<sub>2</sub>O, en comparación con pacientes ventilados con 10ml/kg y PEEP de 0.

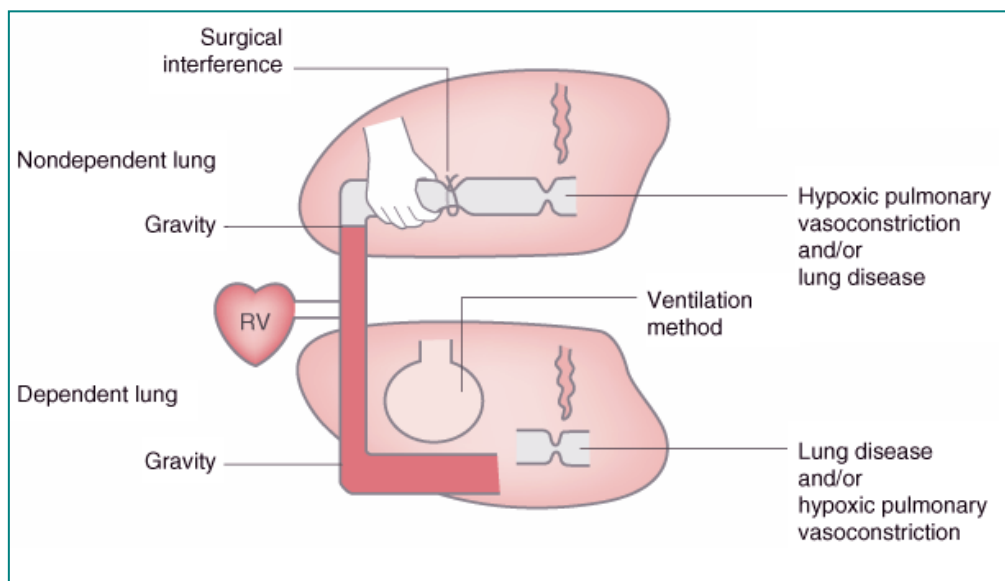
Por el contrario, Wrigge et al (101), no fueron capaces de obtener diferencias en parámetros inflamatorios y de oxigenación, entre pacientes de cirugía torácica ventilados con  $V_t$  de 6ml/kg y PEEP, en comparación con los que se ventilaban con volúmenes altos (10-15ml/kg) sin PEEP. Aunque los trabajos actuales apuntan claramente los beneficios de la estrategia ventilatoria de protección pulmonar, se necesitan estudios con más poder estadístico y un diseño adecuado que demuestren sin matices relación entre la ventilación y los resultados clínicos.

Misthos et al., no sólo relacionan la ventilación unipulmonar con un mayor nivel de estrés oxidativo, medido mediante niveles plasmáticos de malonaldehído, sino que encuentran una correlación positiva entre el grado de estrés oxidativo y la duración de la ventilación pulmonar selectiva. Es más, estos autores encuentran que la VUP de más de una hora de duración, con el nivel oxidativo que conlleva, es un factor de riesgo independiente para la aparición de complicaciones clínicas como arritmias e hipertensión pulmonar (93, 96).

#### **D) Sobrecarga de fluidos durante la cirugía de resección**

Entre los mecanismos fisiopatológicos de la lesión pulmonar aguda postoracotomía, se encuentra el aumento de la permeabilidad vascular, que condiciona infiltrados radiológicos, sin que medie un aumento de la presión hidrostática pulmonar.

En este contexto, parece razonable una fluidoterapia restrictiva guiada por objetivos, en el periodo perioperatorio de las cirugía mayor torácica.



**Fig 13: En la figura se resumen todos los factores que contribuyen a la lesión pulmonar durante la cirugía de resección (83)**

## 1.4 Preacondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión

En 1986, Murry et al., observaron que el tamaño de un infarto de miocardio se reducía de forma considerable si se sometía al territorio infartado a varios periodos de isquemia, intercalando periodos de reperfusión, inmediatamente antes de la inducción experimental del infarto (102). Este procedimiento pasó a llamarse preacondicionamiento isquémico. Siguiendo esta terminología, cuando se aplican breves periodos de isquemia, seguidos de reperfusión, con posterioridad al insulto isquémico, se habla de postacondicionamiento isquémico.

El preacondicionamiento local puede tener muchas limitaciones de orden práctico y suponer un gran riesgo (103), mientras que el preacondicionamiento a distancia o remoto de un órgano por isquemia-reperfusión, es otra variante de



preacondicionamiento y con mayor aplicabilidad clínica. El concepto de preacondicionamiento a distancia fue descrito por Przyklenk en 1993 (104) al conseguir reducir el tamaño de un infarto de miocardio en el territorio de la arteria coronaria descendente anterior mediante breves periodos de isquemia-reperfusión en la arteria coronaria circunfleja. Birnbaum et al, en 1997 consiguieron demostrar que la isquemia en el músculo esquelético inducía la reducción del tamaño de un infarto de miocardio experimental (105) y Oxman et al. (106) en un intento de hacer menos invasivo el procedimiento, demostraron que era posible preacondicionar un corazón de rata mediante la aplicación de un torniquete durante 10 minutos en las patas. Posteriormente, el grupo de McAllister diseñó el preacondicionamiento remoto isquémico tal como lo conocemos, mediante el inflado y deshinchado de un manguito de presión a 200 mmHg colocado en un brazo o en una pierna, durante tres ciclos, cada uno de ellos con 5 minutos de hinchado y 5 de deshinchado. Este grupo, trabajó en primer lugar con voluntarios sanos y posteriormente con pacientes con enfermedad coronaria estable (107-109).

Mediante el proceso de preacondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión (RIPC) se ha demostrado protección tisular frente al estrés oxidativo en diferentes órganos. El mas estudiado ha sido el corazón, encontrándose suficiente evidencia de protección endotelial y frente al daño miocárdico tanto en cirugía de bypass aorto coronario, cirugía valvular, así como en cirugía percutánea y en técnicas de reperfusión post IAM (110-112). También se ha documentado disminución del daño tisular producido por isquemia-reperfusión por preacondicionamiento remoto en otros territorios como el cerebro, riñones, hígado, intestino y piel (113).

Organo	Resultado
<b>Corazón</b>	
BPAC	Reducción de niveles de troponina (114)
BPAC	Reducción de niveles de troponina y mortalidad (115)
PCI	Reducción de niveles de troponina (111)
<b>Cerebro</b>	
Endarterectomía carotídea	Reducción de hipotensión mantenida intraoperatoria
AIT/ACV	Reducción de recurrencia de AIT y aumento de perfusión cerebral (116)
<b>Riñón</b>	
Cirugía cardíaca valvular	Reducción de estancia en UCI (117)
Cirugía cardíaca	Reducción de riesgo absoluto de IRA (118)
Angiografía coronaria	Reducción de IRA inducida por contraste (119)

**Tabla 3: Ensayos clínicos con RIPC (modificada de Zarback et al) (120)**

*BPAC: bypass aortocoronario, IPC: intervención percutánea, AIT: accidente isquémico transitorio, ACV: accidente cerebrovascular*

En la cirugía de resección pulmonar se ha objetivado recientemente una mejoría en la oxigenación y en parámetros de inflamación a nivel sistémico en pacientes a los que se sometió a preacondicionamiento remoto, en comparación con controles (5).

El mecanismo por el cual el RIPC confiere protección no está completamente dilucidado. Se han propuesto diversas sustancias y señales implicadas, lo que sugiere un proceso complejo y multifactorial (110) .

### 1.4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DEL PREACONDICIONAMIENTO REMOTO

#### A) Mediadores celulares

##### PROTEINCINASA C

Se ha postulado un rol central de las proteincinasas para numerosos triggers, como la bradicinina, adenosina y los opioides. En concreto, la proteincinasa C (PKC) y la proteincinasa G (PKG) han demostrado ser mediadores de la protección inducida por la isquemia-reperfusión (121, 122). Estudios experimentales han demostrado que la cardioprotección por RIPC podía abolirse con un bloqueador no específico de la PKC. Asimismo, se ha demostrado activación de la PKC- $\epsilon$  (isoforma con mayor efecto cardioprotector) en corazones bajo el efecto del preconditionamiento remoto, como respuesta a la bradicinina y al mediador CGRP (*Calcitonin gene-related peptide*)(123, 124).

##### CANAL DE POTASIO ATP-DEPENDIENTE

El objetivo central de la acción de las proteincinasas es el canal de potasio ATP-dependiente. Dicho canal activado, reduce la permeabilidad de membrana, contribuyendo a la supervivencia celular (125). Se postula que las diferentes señales que genera el preconditionamiento remoto, conllevan la apertura de los canales de potasio ATP-dependientes en la mitocondria. Esto aumentaría la producción de RLO que a su vez ejercerían un efecto protector tisular al inhibir la apertura de unos canales mitocondriales, los mPTP (*mitochondrial Permeability Transition Pore*) (126) y al activar ciertas cinasas (127).

##### ÓXIDO NÍTRICO

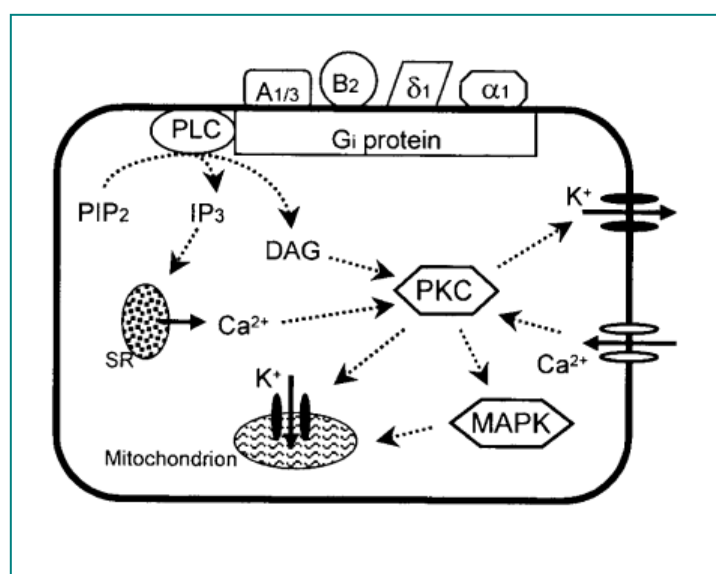
Por otra parte, hay evidencia de que el óxido nítrico (NO) es un agente protector celular, por ser tanto mediador como activador del preconditionamiento (128). Este efecto protector desaparece cuando se aplican inhibidores no selectivos de la NOS (129).

MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE (mPTP)

Los mPTP son canales de la membrana mitocondrial que se activan a los pocos minutos de iniciarse la reperfusión, por efecto de la caída de ATP al inhibirse la fosforilación oxidativa a consecuencia de la isquemia. Estos canales abiertos inducen edema mitocondrial y posterior muerte celular. Al bloquear la apertura de los mPTP se consigue cardioprotección, en estudios con RIPC. Se ha visto que los agonistas del receptor opioide  $\kappa$  son capaces de inducir la apertura de los mPTP. Al bloquear estos receptores, en un estudio experimental, se consigue reducir el tamaño de un infarto de miocardio inducido, mediante RIPC aplicado en una extremidad, demostrando de forma indirecta la implicación de los mPTP en la protección celular por preconditionamiento remoto.

RADICALES LIBRES DE OXÍGENO

A pesar del papel central que tienen los RLO en el daño celular por isquemia-reperfusión se ha comprobado que también son mediadores en los efectos protectores atribuidos a RIPC. Se ha demostrado que el uso de un bloqueador de los RLO o *scavenger* es capaz de abolir el efecto protector del RIPC (130).



**Figura 14: Mecanismos celulares del preconditionamiento isquémico.** La activación de adenosina A1 y A3 (A1/3), bradikinina (B2), receptores opioides  $\delta 1$  y receptores adrenérgicos  $\alpha 1$  estimulan la fosfolipasa C (PLC) a través de las proteínas G inhibitoras (Gi.) La PLC produce diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato (IP3) que activan

*la proteínkinasa C (PKC). Esta mejora la apertura de los canales de potasio ATP-dependientes (K<sup>+</sup>), probablemente a través de las kinasas (MAPK). PIP2: fosfatidilinositol; SR: retículo sarcoplásmico. Reproducida de Kato et al(131)*

## **B) Mediadores humorales y neuronales.**

### HUMORALES

Se ha propuesto que diversas sustancias endógenas puedan generarse en el órgano remoto, donde se aplica el RIPC y pasen al torrente circulatorio para hacer su efecto a distancia, en el órgano diana, a través de un receptor y la activación de diversas vías de señalización intracelular. Algunas de las sustancias propuestas como mediadores son:

Catecolaminas: algunas catecolaminas mimetizan el efecto protector del preacondicionamiento, sugiriendo la implicación de estas sustancias en la isquemia remota (132).

Bradicinina: se ha demostrado que los efectos de RIPC (disminución del tamaño de un infarto) desaparecen si se administra un antagonista del receptor B2 de la bradicinina (133).

Adenosina: El uso de 8-sulfofenilteofilina (8-SPT), un antagonista inespecífico del receptor de adenosina, previo a un protocolo de RIPC, causa la abolición de los efectos protectores del preacondicionamiento (134).

Opioides: Se ha propuesto que los opioides endógenos que se generan durante el preacondicionamiento remoto pasan a la circulación y ejercen su efecto a distancia (135). El hecho que la naloxona, un antagonista opioide limite los efectos de RIPC, refuerzan esta hipótesis. Al parecer, los opiodes ejercerían su efecto a través del receptor  $\delta_1$ , pero este punto es controvertido (136, 137).

CGRP (*calcitonin gene-related peptide*): Este neurotransmisor se libera en las terminaciones sensitivas capsaicina-sensibles, que a su vez son estimuladas por el NO que

se genera por el estímulo del preconditionamiento. Las CGRP llegarían hasta el órgano diana, ejerciendo su efecto al activar las PKC- $\epsilon$ .

Otros agentes implicados por su liberación a la circulación sistémica durante el RIPC son el factor de transcripción inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ )(138) así como sustancias antioxidantes y endocannabinoides (139)

### NEURONALES

También se ha propuesto que por la acción de RIPC en el órgano remoto se provoque una respuesta eferente que vía activación neuronal tenga su efecto en el órgano diana. El bloqueo de los ganglios autonómicos durante el RIPC por oclusión de la arteria mesentérica, ha demostrado tener un efecto cardioprotector, lo que reforzaría la idea de una implicación de las vías neuronales (140).

Algunas sustancias que se han relacionado con esta activación neuronal serían adenosina (110, 134), bradicinina (123, 133) y CGRP (141).

### **C) Efectos antiinflamatorios**

Se ha propuesto también que el preconditionamiento remoto podría conferir protección tisular al producir una respuesta sistémica con supresión de los mecanismos inflamatorios (mediante la supresión de la expresión de genes que codifican proteínas clave en la síntesis de citocinas, quimiotaxis de leucocitos, adhesión, migración, así como en los mecanismos de inmunidad innata) y de apoptosis (142, 143).

Durante el RIPC se reduce la activación de los neutrófilos a través de la expresión de la molécula de adhesión, CD11b, así como la formación de complejos neutrófilo-plaqueta (142).

Se ha demostrado también un cambio en el patrón de síntesis del factor de necrosis tumoral (TNF) así como una activación del receptor de TNF (TNFR1) el cual induce la producción de SOD, un potente mecanismo antioxidante.

Asimismo, se han implicado en este proceso a las cinasas MAPKs (*mitogen activated protein kinases*) p38, ERK1/2 y JNK (144).

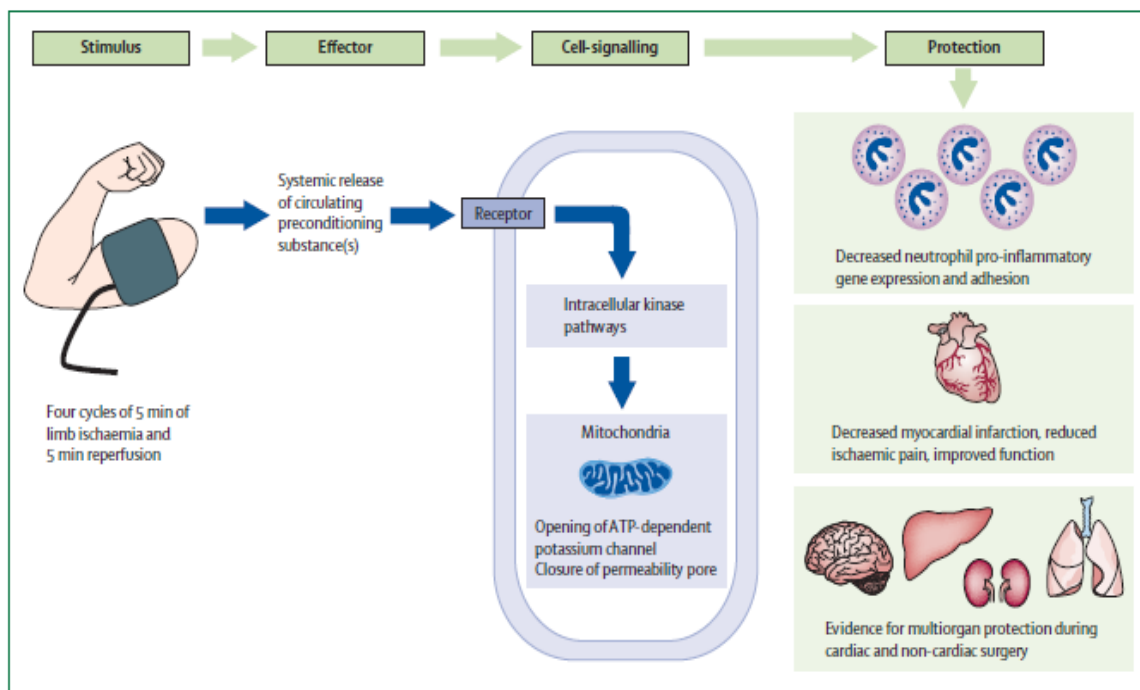


Figura 15: Esquema de los mecanismos implicados en RIPC. Reproducido de Kharabanda (145)

## 1.5 Condensado del aire exhalado (CAE)

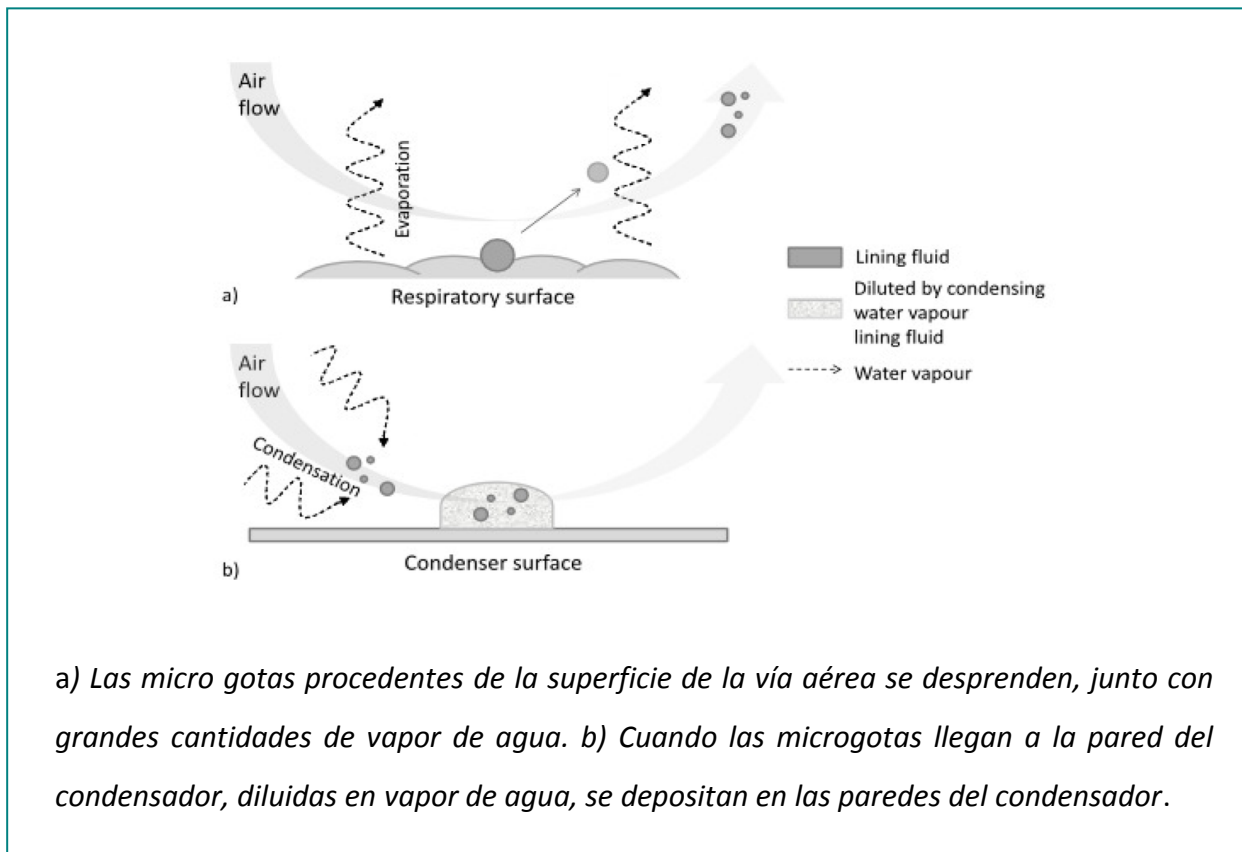
Para el estudio de la patología pulmonar inflamatoria, las técnicas clásicas de estudio han sido la biopsia, el cepillado y el lavado broncoalveolar (LBA). En la década de los ochenta se iniciaron varios grupos en el análisis del CAE, por la clara ventaja que suponía el disponer de una herramienta diagnóstica no invasiva para obtener muestras directamente del árbol bronquial. Además, se trata de un método sencillo, económico, que puede repetirse numerosas ocasiones en un mismo paciente. Con la ventaja adicional que puede usarse en pacientes bajo ventilación mecánica así como en población pediátrica en la consulta externa.

### 1.5.1 COMPOSICIÓN DE LAS MUESTRAS DE CAE

El CAE refleja la composición del fluido extracelular de revestimiento epitelial pulmonar. Está constituido por una *fase gaseosa*, donde es posible detectar distintos compuestos volátiles endógenos tales como óxido nítrico (NO) o el monóxido de carbono (CO) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), y una *fase acuosa* donde aparecen en suspensión distintos compuestos no volátiles que pueden ser recuperados mediante la condensación del aire exhalado por técnicas de enfriamiento (146, 147).

Entre los compuestos no volátiles se encuentran moléculas tan pequeñas como el sodio y tan grandes como inmunoglobulinas.





**Figura 16: Representación de la formación de una muestra de CAE**

*Reproducida de Janicka et al (47)*

La determinación de diferentes sustancias en el CAE permite la estimación de estrés oxidativo pulmonar a través de la medición de peróxido de hidrógeno o de productos derivados de peroxidación lipídica como el 8-isoprostano entre otros. Del mismo modo, diversos marcadores inflamatorios como productos derivados del metabolismo del óxido nítrico (nitritos, nitratos, nitrosotioles, nitrotirosina), citocinas (IL-1, IL-8, TNF-alfa) y leucotrienos (LTB<sub>4</sub>, cisteinil-LTs) también pueden ser cuantificados en el condensado del aire exhalado. Así mismo, puede medirse el pH del CAE y analizar los cambios tras las diferentes intervenciones terapéuticas.

### 1.5.2 MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CAE

Desde que se conoce que el estrés oxidativo tiene un papel relevante en muchos procesos pulmonares, se ha trabajado en la determinación de numerosos marcadores que reflejen el daño oxidativo.

Aunque los productos derivados de la acción de los RLO se puedan determinar *in vitro*, a la hora de elegir un buen marcador clínico, ha de considerarse no sólo su importancia *in vivo*, sino también los problemas analíticos que afecten a la sensibilidad y especificidad de la técnica. La determinación de productos en los líquidos biológicos a veces implica un complejo tratamiento de la muestra con procesos de extracción y purificación que son costosos en tiempo e infraestructura.

En CAE se han podido medir con éxito isoprostanos, peróxido de hidrógeno, MDA, 4-hidroxi-2nonenal, antioxidantes, glutatión y representantes de estrés nitrosativo, como nitratos y nitritos.

#### A) Isoprostanos.

Los isoprostanos (como el 8-iso-PGF<sub>2</sub>α) son una familia de productos procedentes del ácido araquidónico, similares a los que producen por la acción de la ciclooxigenasa (COX) pero que se generan a partir de una acción no enzimática y mediada por RLO.

Los isoprostanos F<sub>2a</sub> son un grupo de 64 compuestos de estructura isomérica a los productos de la COX (PGF<sub>2a</sub>) y suponen el mejor acercamiento al estrés oxidativo *in vivo*, constituyendo una excelente herramienta para el estudio de la patogenia de las enfermedades en las que están implicados los RLO (148, 149).

Las principales ventajas de los isoprostanos como marcadores de estrés oxidativo son:

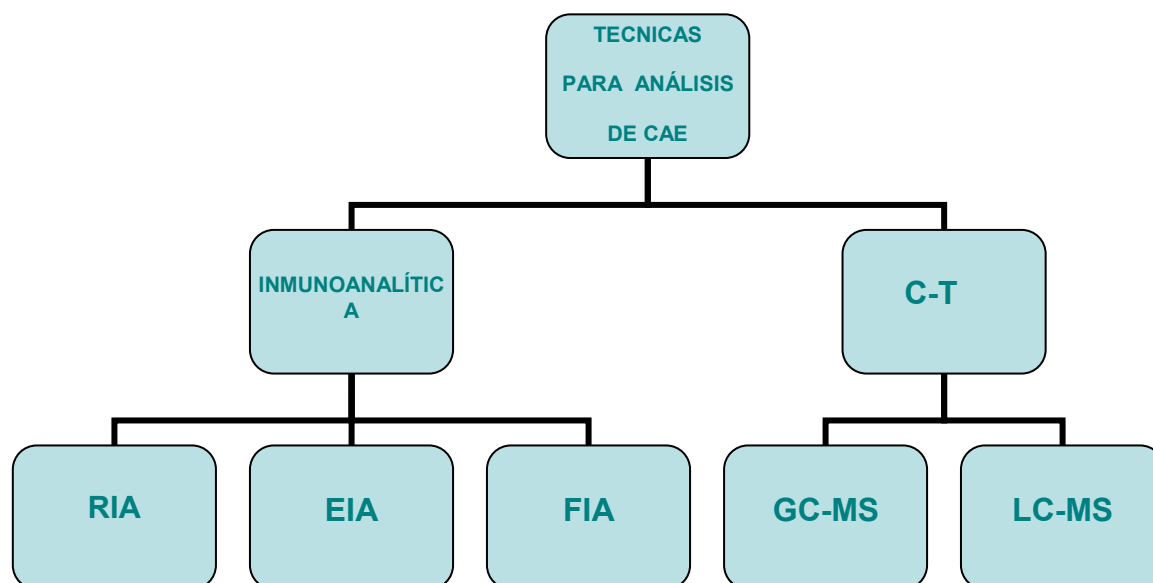
- Son químicamente estables
- Se producen *in vivo*
- Son específicos de la peroxidación lipídica
- Se pueden utilizar para describir el comportamiento de los antioxidantes

Niveles aumentados de 8-isoprostano se consideran un buen marcador de peroxidación lipídica por los RLO, dada su estabilidad química.

Los niveles de 8-isoprostano en personas sanas varían entre cero y 40 pg/ml. El rango de concentración en distintas patologías, varía de unos estudios a otros y en función de la técnica empleada. Se ha encontrado aumento de isoprostanos en múltiples procesos: asma (150-153), EPOC (154), enfermedad pulmonar intersticial (55), sarcoidosis (155), fibrosis quística (156), ADRS (157) y apnea obstructiva del sueño (158). En pacientes EPOC, además se ha comparado los niveles de 8-isoprostano en CAE entre ex fumadores y fumadores activos, sin que se encuentren diferencias, lo cual sugiere que este marcador depende del estrés oxidativo resultante del estado inflamatorio en esta patología (159). Un estudio reciente sugiere una relación entre y la inflamación de la vía aérea pequeña (160). Con respecto al efecto de la ventilación mecánica sobre el estrés oxidativo, se ha visto en pacientes, intubados durante procedimientos de cirugía menor, mayores niveles de 8-isoprostano sólo en aquellos con criterios de ARDS (157), en comparación con sujetos sanos. Y en otro estudio, no encuentran diferencias en la concentración de isoprostanos entre pacientes en VM y sujetos sanos no fumadores (161).

### **Determinación de Isoprostanos en muestras de CAE**

La determinación de isoprostanos en CAE se basa en técnicas cromatográficas o inmunoanalíticas, como se muestra en la figura:



**Figura 17: Técnicas analíticas más usadas para determinar isoprostanos en CAE**

*C-T : técnicas cromatográficas, RIA: radioinmunoensayo, EIA: enzimoimmunoensayo, FIA: inmunoensayo de fluorescencia, GC-MS: cromatografía de gases-espectometría de masas, LC-MS: cromatografía líquida-espectometría de masas*

Las técnicas cromatográficas, acopladas a la espectrometría de masas se consideran el *gold standard* para la detección de isoprostanos, permitiendo cuantificar varios en un ensayo. Mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas, Carpenter et al (157) encontraron 8-isoprostano sólo en algunos sujetos sanos, sin embargo, Moloney et al (94), encontraron niveles detectables de 8-isoprostano en CAE en todos los sujetos estudiados.

Sin embargo, un gran número de publicaciones ya utilizan *kits* comercializados de inmunoensayo enzimático (162-164), que aunque miden un solo isoprostano, son más simples técnicamente y más asequibles a la mayoría de laboratorios. Originalmente están validados para otras muestras como plasma, orina o tejidos. Sin embargo, al ser el CAE un tipo de muestra con bajas concentraciones de proteínas y aminoácidos, la interferencias de la muestra a la hora de realizar el análisis es mínimo. No hay estudios sobre la variabilidad intrasujeto día a día.

**B) Peróxido de hidrógeno**

$H_2O_2$  es una molécula volátil, que se ha recogido en CAE, por numerosos grupos de trabajo (147). En el sistema respiratorio el  $H_2O_2$  procede tanto de células inflamatorias (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos) como de las células epiteliales. Se ha evidenciado un aumento de niveles de  $H_2O_2$  en pacientes con asma, en fumadores, en pacientes con bronquiectasias, EPOC, ALI/ARDS así como en daño pulmonar por isquemia- reperfusión y en el postoperatorio de cirugía pulmonar (146). En pacientes con asma severo, además, los niveles de  $H_2O_2$  tienen una correlación con la gravedad de la enfermedad y de la función pulmonar (165). Además, este parámetro se reduce con la toma de corticoesteroides inhalados.

**C) Nitritos/Nitratos\_**

Nitritos ( $NO_2$ ) y nitratos ( $NO_3$ ) son radicales libres de Nitrógeno, presentes en la vía respiratoria. Son el producto final del metabolismo del NO y del anión peroxinitrito, un potente oxidante (166). Están presentes en el revestimiento epitelial pulmonar, y pueden detectarse mediante diferentes métodos (espectrofotométrico, fluorimétrico y mediante quimioluminiscencia). Hay que tener en cuenta el tipo de ensayo para considerar el límite de detección. Se han encontrado nitratos/ nitritos elevados en pacientes con asma, bronquiectasias y con lesión pulmonar aguda. No se ha documentado la variabilidad intersujeto, día a día.

**D) pH .**

El pH es un reflejo del equilibrio ácido-básico del fluido que reviste las vías aéreas, equilibrio que se alcanza entre los diferentes ácidos y bases generados, y los sistemas tampón. El pH, de entre los componentes del CAE, fundamentalmente depende de los

compuestos volátiles como el CO<sub>2</sub>, ácidos orgánicos y amoníaco. Puede verse influido por el reflujo gástrico, la inhalación de humos o el amoníaco de la boca. El pH del CAE se ha estudiado en numerosos procesos patológicos, entre los que destaca el asma bronquial. El pH desciende en el CAE durante las agudizaciones de asma y aumenta tras el tratamiento con corticoesteroides inhalados.

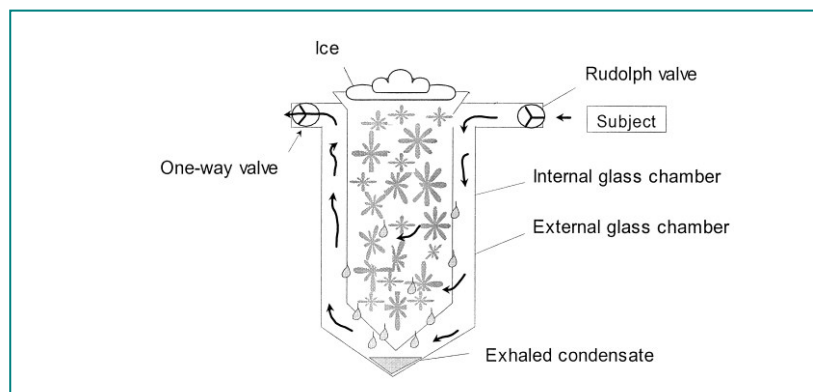
El pH es muy inestable una vez obtenida la muestra, sobretodo, debido a la acidificación por CO<sub>2</sub>. El método más ampliamente difundido para estabilizar el pH de la muestra es la deaireación con Argón. Se hace burbujear el gas, libre en CO<sub>2</sub> hasta que se estabiliza en pH. El grupo de Prieto et al, comparando varios tiempos (2, 4 y 8 minutos), han establecido que no es conveniente menos de 4 minutos de deaireación (167). En casi todos los trabajos publicados, se opta por una deaireación de 10 minutos.

### **1.5.3 RECOGIDA DEL CONDENSADO DE AIRE EXHALADO**

La base de los sistemas de recogida de CAE la constituye una unidad enfriada a 0°C, a través de la cual pasa el aire exhalado, conteniendo las sustancias volátiles y no volátiles, que al contacto con este condensador, se depositan en forma de condensado. Como se ha mencionado, se trata de un método completamente no invasivo, sencillo, y que puede llevarse a cabo en cualquier situación clínica.

El tiempo de recogida para adultos oscila entre los 15 y 20 minutos. En este tiempo, se suelen recoger de 1 a 3 mililitros de condensado. Para la concentración de 8-isoprostano en CAE no se han encontrado diferencias entre 10, 15 o 20 minutos de recogida (146). Las cámaras de condensación se han fabricado de cristal, polistireno o polipropileno. El polistireno no es adecuado para la recogida de lípidos debido a una posible adsorción. Pero todavía se desconoce cómo interactúan las diferentes superficies con los distintos componentes del CAE. En un estudio, se comparan diferentes materiales de los condensadores, con las concentraciones de 8-isoprostano (168). En el mercado existen varios dispositivos para la recogida del CAE, pero algunos grupos siguen utilizando modelos de fabricación propia. Los principales dispositivos comercializados son (169): Ecoscreen, RTube, Anacon y tubo DeCCs. Hasta la fecha no hay una

estandarización completa de la obtención de muestras y su análisis. Sin embargo, existe una serie de recomendaciones recogidas por el grupo de trabajo *ATS/ERS Task Force (Exhaled Breath Condensate: methodological recommendations and unresolved questions)* (146). Entre estas recomendaciones, se incluye el uso del mismo dispositivo durante toda la duración de un estudio, con el fin de hacer los resultados comparables. El material del equipamiento que esté en contacto con la muestra ha de ser inerte, para evitar posibles reacciones con los productos que están presentes en el CAE. Asimismo, el dispositivo debe diseñarse para evitar la contaminación con saliva y debe evitarse la reinhalación desde el condensador, mediante válvulas unidireccionales. Estas últimas recomendaciones, se obvian cuando la muestra se recoge de pacientes en ventilación mecánica, puesto que la muestra procede del tubo endotraqueal y se recoge de la rama espiratoria del circuito del respirador.



**Figura 18: Representación esquemática de un dispositivo para obtención de CAE.** Tomado de Horvath et al (170)

## 2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS

### 2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Durante la cirugía de resección pulmonar el pulmón se colapsa y mediante el mecanismo de vasoconstricción pulmonar hipóxica también permanece hipoperfundido. Durante el periodo de hipoxia tisular, se producen especies reactivas de oxígeno. Se ha demostrado que el daño tisular secundario a la ventilación unipulmonar, con colapso-hipoperfusión y reexpansión-reperfusión del pulmón, es causa de complicaciones postoperatorias, condiciona la viabilidad de los órganos y por tanto la supervivencia de los pacientes. En la cirugía de resección pulmonar, se han ensayado diversos procedimientos con el fin de prevenir el daño pulmonar, no siendo ninguno hasta la fecha completamente satisfactorio.

Por otra parte, se ha demostrado que el preacondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión es eficaz frente al daño generado por los radicales libres de oxígeno en múltiples órganos y en gran variedad de situaciones clínicas, en las que la hipoxia tisular tiene un papel predominante.

Se plantea la *hipótesis* de que el preacondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión, mediante la aplicación de un manguito de presión en una de las extremidades, es capaz de inducir citoprotección pulmonar al producir una disminución significativa del estrés oxidativo durante la lobectomía pulmonar en pacientes con neoplasia de pulmón.



## 2.2 OBJETIVOS

### Objetivo principal

Para poder aceptar o rechazar esta hipótesis, es necesario determinar marcadores de estrés oxidativo en pacientes con cáncer de pulmón sometidos a lobectomía pulmonar a los que se realiza RIPC y compararlos con controles, lo cual es el primer y principal objetivo de esta tesis.

Para desarrollar el objetivo establecido, se han planteado como **Objetivos específicos** del presente trabajo:

1. Determinación de los niveles de 8-isoprostano (8-iso-PGF $2\alpha$ ), un producto estable de la lipoperoxidación por RLO en el CAE durante el colapso pulmonar en la lobectomía y tras la reexpansión pulmonar. Los niveles de 8 -isoprostano (8-iso-PGF $2\alpha$ ) en CAE constituyen la **variable principal** del estudio.
2. Comparar los niveles de 8-isoprostano en el CAE y plasma de los controles con los obtenidos en pacientes sometidos a preconditionamiento remoto por isquemia reperfusión.
3. Medición de otros biomarcadores de estrés oxidativo: nitritos+nitratos (NO $_2^-$  + NO $_3^-$ ) péroxido de hidrógeno (H $_2$ O $_2$ ) y pH en CAE durante la lobectomía pulmonar y comparar los valores en los controles con los obtenidos en los pacientes del grupo intervención (RIPC).
- 4 Estudio de la aparición de complicaciones durante el postoperatorio inmediato: ALI/ADRS (mediante PO $_2$ /FiO $_2$ ), la aparición de arritmias, y la necesidad de reintervención quirúrgica.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

5. Establecer si existe correlación entre el tiempo total de colapso pulmonar durante la lobectomía y el grado de daño oxidativo medido en el condensado de agua exhalada pulmonar.

# **CAPÍTULO II**

## **METODOLOGÍA**



Este estudio forma parte de un proyecto global para el estudio del fenómeno del estrés oxidativo y el mecanismo de la isquemia-reperfusión en la cirugía programada cardiopulmonar del Servicio de Anestesiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Se han realizado estudios en cirugía cardíaca con (171) y sin circulación extracorpórea (172), en cirugía traumatológica (173, 174), de resección colónica (174, 175) y en cirugía torácica, recogiendo muestras sanguíneas y de CAE (173).

En base a los datos preliminares, se decide estudiar la protección con preacondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión en pacientes sometidos a lobectomía pulmonar por neoplasia. Se eligieron 53 pacientes de forma sucesiva, prospectiva y aleatoria, un grupo de pacientes recibieron ciclos de preacondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión para el estudio de varios marcadores de estrés oxidativo en sangre y en EBC de forma simultánea y también para su comparación con el grupo control.

## 1. Pacientes

Se siguieron las recomendaciones de la convención de Helsinki sobre la investigación biomédica en seres humanos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Los pacientes fueron informados e ingresaron en el estudio voluntariamente, firmando el correspondiente consentimiento informado.

Se reclutaron 53 pacientes diagnosticados de neoplasia pulmonar en estadios I y II programados para lobectomía. Se seleccionan un total de 14 mujeres y 39 hombres, de edades comprendidas entre los 38 y los 84 años.

Los criterios de exclusión para participar en el estudio fueron los siguientes:

- Administración previa de radioterapia o quimioterapia,
- Ingesta concomitante de vitaminas antioxidantes,
- Clínica infecciosa sistémica o fiebre de más de 38°C,
- Edad menor de 18 años
- Negativa del paciente a participar en el estudio.

Todos los pacientes ingresaron en la Unidad de Reanimación, al menos veinticuatro horas después de la cirugía y se les realizó un seguimiento durante toda la estancia hospitalaria.

## 2. Protocolo de administración de anestesia y monitorización.

Previo a la inducción anestésica, se procede a la inserción de un **cateter epidural** torácico (T4-T5, T5-T6) para la analgesia intra y postoperatoria. La correcta posición del catéter y el nivel sensitivo se comprueban antes de la inducción anestésica. Durante el postoperatorio a los pacientes se les mide el grado de dolor mediante una Escala Analógica Visual y se trata según el esquema analgésico de la Unidad de Dolor Agudo del servicio de Anestesiología. El catéter se retira a las 48-72 horas.

Para la **anestesia general** se usa thiopental sódico (3-5 mg/kg), fentanilo (1-3 µg/kg) y rocuronio (0,6 mg/kg) o cisatracurio. El mantenimiento de la anestesia se realiza con sevoflurano (1-2%), fentanilo y rocuronio o cisatracurio.

Inmediatamente después, se procede a la intubación orotraqueal mediante un tubo de doble luz izquierdo y del tamaño apropiado (37 o 39F, Covidien IIC, Mansfield, MA). La correcta posición del tubo endotraqueal se confirma por visión fibrobroncoscópica (BF-MP60, Olympus, Tokio, Japón)

Una vez bajo los efectos de la anestesia general, se canaliza un acceso venoso de gran calibre (14-16G) así como un catéter de arteria radial para monitorización invasiva de la presión arterial y toma de muestras de sangre. El paciente se pasa a posición decúbito lateral, vigilándose los puntos de apoyo y de presión.



**Figura 19: Paciente posicionado para cirugía de resección pulmonar**

La **ventilación** pulmonar durante toda la cirugía se realiza siguiendo el siguiente protocolo, con un *volumen tidal* de 7-8 ml/kg de peso ideal, en ventilación bipulmonar (VBP) y un *volumen tidal* de 6ml/kg en ventilación unipulmonar (VPS). La fracción inspiratoria de oxígeno (FiO<sub>2</sub>) de partida es de 0,5. Si se precisan incrementos en la FiO<sub>2</sub>, se documenta en el cuaderno de datos. Los valores de PEEP (positive end expiratory pressure) entre 5-7 mmHg. La frecuencia respiratoria se ajusta para conseguir ETCO<sub>2</sub> entre 30 y 45 mmHg. En caso de desaturación por debajo de 92%, se realizan las siguientes maniobras en este orden:

- 1) Comprobación de la correcta posición del TDL mediante el fibrobroncoscopio, ya que durante la movilización del paciente puede sufrir desplazamientos.
- 2) Aumento de FiO<sub>2</sub>.
- 3) Descartar complicaciones de tipo hemodinámico.
- 4) Administración de presión positiva continua (CPAP) al pulmón no ventilado.
- 5) Añadir PEEP al pulmón ventilado.
- 6) Si a pesar de estas maniobras no puede corregirse la hipoxemia, se deben introducir ciclos de ventilación bipulmonar (maniobras de reclutamiento). Llegados a este punto, los pacientes salen del estudio dado que no pueden establecerse de forma adecuada los tiempos de recogida de muestras.

La **fluidoterapia** y el uso de vasopresores es el estándar en estos procedimientos, para el adecuado mantenimiento hemodinámica, a criterio del anestesiólogo responsable.

Tras la última recogida de muestra de CAE (T<sub>3</sub>) se extuban los pacientes y son trasladados a la unidad de reanimación donde permanecen 24 horas monitorizados. Se administra oxigenoterapia con mascarilla facial al 50%, para mantener la saturación de oxígeno por pulsioximetría por encima del 94-95%.

El control de los pacientes incluye gasometrías seriadas, ECG, radiografía de tórax y determinaciones bioquímicas con el fin de detectar complicaciones postoperatorias.

En caso de diagnóstico de ALI/ARDS, necesidad de reintubación o asistencia ventilatoria no invasiva, se recoge en el protocolo del estudio. También se documentan las arritmias de nueva aparición y la insuficiencia cardiaca postoperatoria.

Para el diagnóstico de ALI/ARDS se siguen los criterios de la *American-European Consensus Conference on ARDS guidelines (176)*, que son los siguientes, a saber: 1) Inicio súbito, 2) infiltrados radiológicos característicos, 3) hipoxemia, para ALI PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> menor de 300 y para ARDS menor de 200, 4) ausencia de insuficiencia cardíaca o sobrecarga de fluidos.

Asimismo, se mide el dolor mediante escala analógica visual (EVA) en la que 0 representa ausencia de dolor y 10 el dolor máximo. Se trata en consecuencia mediante anestésicos vía epidural, AINES y opiáceos.

### 3. Protocolo quirúrgico

El abordaje empleado para la resección pulmonar tipo lobectomía en todos los pacientes incluidos en el estudio ha sido la toracotomía posterolateral, a través del 5<sup>º</sup> espacio intercostal con preservación del musculo dorsal ancho. En primer lugar se procedía a liberar las adherencias pleurales presentes, junto con la sección del ligamento triangular inferior, mediante el empleo de electrocauterio, con el fin de tener el pulmón accesible a la exploración y así facilitar la resección.



Los pasos quirúrgicos que se seguían en la lobectomía pulmonar, son:

- Sección de la pleura mediastínica anterior y posterior.
- Disección de la vena pulmonar pertinente al lóbulo a extirpar, con posterior sección de la misma mediante autosutura mecánica vascular. En pocos casos se empleó la ligadura manual con seda.
- Disección de las distintas ramas arteriales nutricias del lóbulo a extirpar y sección de las mismas con autosutura mecánica vascular. En pocos casos se empleó la ligadura manual con seda.
- Apertura de la cisura en aquellos casos de cisura incompleta, mediante el empleo de electrocoagulación bipolar, ultracision y autosutura mecánica de parénquima.
- Disección del bronquio lobar más linfadenectomía del área ganglionar interbronquial (a 11) y sección del mismo con autosutura mecánica bronquial.
- Estudio intraoperatorio del recorte bronquial que de ser positivo obligaba a ampliar el borde de resección bronquial y nueva sutura.
- Comprobación de la hemostasia y de la aerostasia y tto. de la misma, en su caso, con el empleo de sellante pulmonar de colágeno y fibrina.
- Linfadenectomía mediastínica sistemática reglada.
- En pocos casos fue necesaria la pleuralización del muñón bronquial solo en aquellos en los que hubiera recibido tto. neoadyuvante o que se sospechaba la necesidad de tto. oncológico adyuvante postoperatorio.
- Drenajes pleurales postoperatorios 1 ó 2 según la complejidad de la cirugía, la calidad del parénquima pulmonar restante y sobre todo según la presencia de fuga aérea durante la cirugía.
- Cierre de la toracotomía mediante el empleo de 3 puntos percostales.
- Cierre de los planos musculares en 2 planos, seguido del cierre del tejido celular subcutáneo. La piel se cerraba con puntos metálicos.
- Los drenajes se conectaban a un frasco con sistema de sello de agua y conectado este a un sistema de vacío.
- Tras la cirugía el paciente pasaba a la Unidad de Reanimación.

#### **4. Aleatorización y enmascaramiento**

Se realizó aleatorización simple usando una tabla de generación de números aleatorios, los números fueron distribuidos en sobres opacos cerrados.

Para garantizar el doble ciego, el manguito de isquemia para realizar el preconditionamiento, se coloca en todos los pacientes, conectado a un monitor independiente del monitor principal del paciente. Se programan los ciclos de la misma manera en todos los pacientes, pero en los controles no se iniciaba el programa, de manera que no había inflado efectivo. De esta manera, el anestesiólogo responsable del manejo intraoperatorio del paciente, desconoce en qué grupo está el paciente, así como el personal de laboratorio encargado de la medición de los diferentes marcadores.

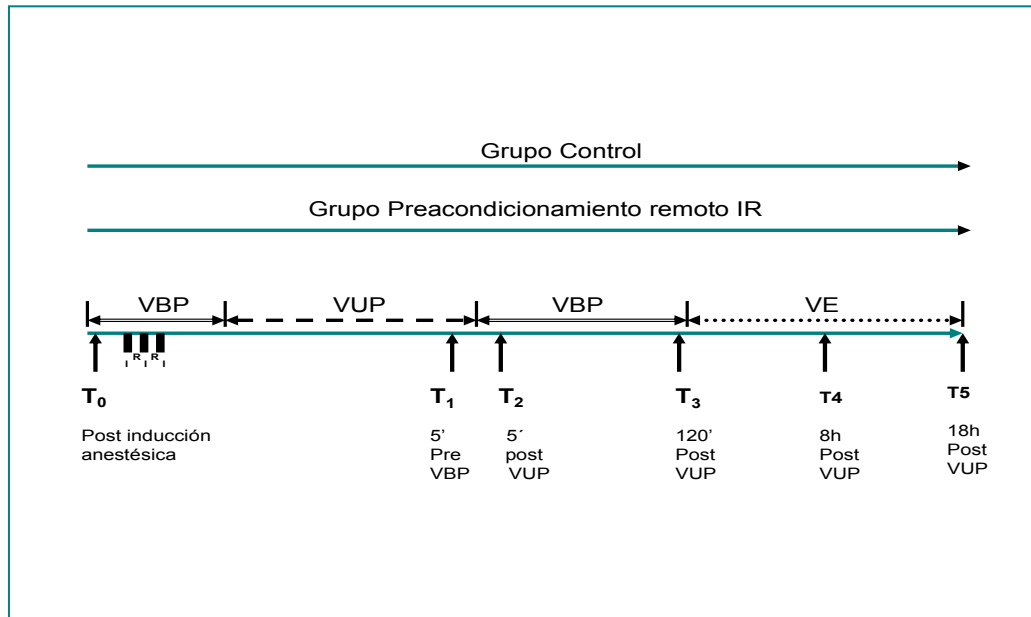
#### **5. Protocolo de preconditionamiento remoto**

El protocolo de IR se aplica inmediatamente después de la inducción anestésica y antes del inicio de la cirugía. El preconditionamiento, consiste en 3 ciclos de isquemia mediante un manguito colocado en un miembro inferior (por encima de la rodilla). La presión asciende a 200 mmHg mediante inflado automático durante 5 minutos y se sigue de 5 minutos deshinchado en cada ciclo, con la consiguiente reperusión. El tiempo invertido total es de 25 minutos.

#### **6. Obtención de muestras de sangre**

De cada paciente se recogen muestras de sangre (tubos de muestra BD Vacutainer PST II con heparina, BD-Plymouth, UK) a través de la línea arterial radial en varios momentos del procedimiento quirúrgico y durante el postoperatorio (ver figura 20).

Los tiempos de recogida de muestras son los siguientes (se esquematizan en la figura 20): inmediatamente tras la inducción anestésica (T0), final de la VUP 5 minutos antes de reiniciar la VBP (T1), 5 minutos después de reiniciar la VBP (T2), 120 minutos después de reiniciar la VBP (T3), ocho horas después (T4) y dieciocho horas después (T5).



**Figura 20: Tiempos del estudio**

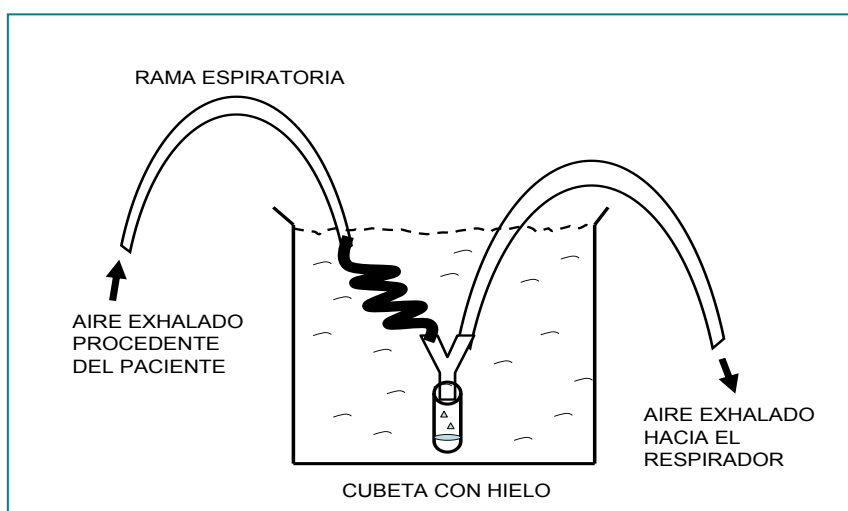
*VBP: ventilación bipulmonar, VUP: ventilación unipulmonar, VE: ventilación espontánea  
I: isquemia, R reperfusión*

Las muestras se guardan en frigorífico a 4 °C y se centrifugan en los 30 minutos posteriores a su recogida a 3000 rpm, durante 12 minutos, posteriormente se recoge el plasma sobrenadante y se guarda hasta su análisis a -80 °C. Los valores de pH, PaO<sub>2</sub>, paCO<sub>2</sub> y PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> se obtiene en cada momento (T0-T5) para su análisis gasométrico (ABL 88 Flex, Radiometer) presente en el área quirúrgica y en Reanimación.

## 7. Obtención de muestras de CAE

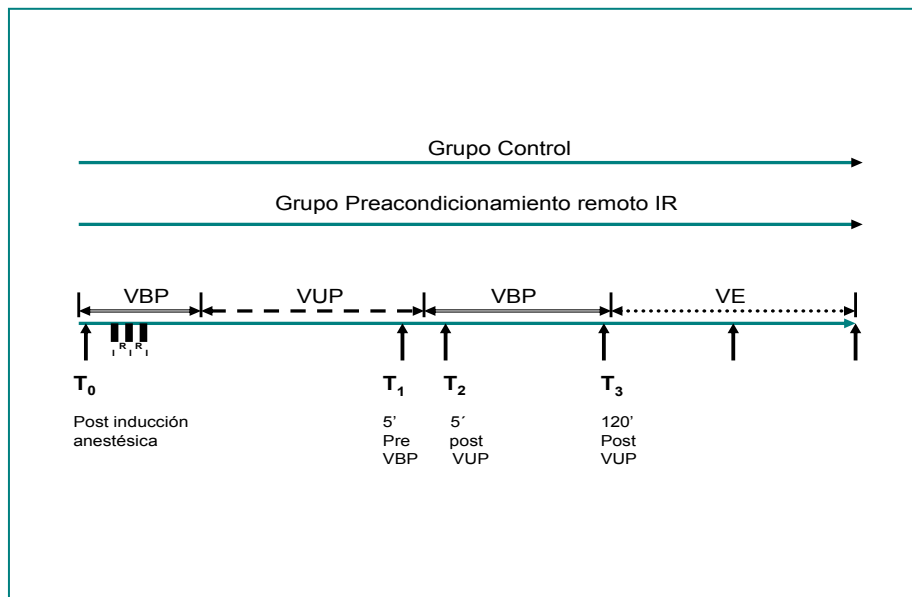
Las muestras de condensado del aire exhalado se obtienen mediante un dispositivo que permite el enfriamiento de un tubo espiral de cristal colector situado en la rama espiratoria del circuito respiratorio que conecta el paciente a la estación de anestesia, recogándose en un tubo de cristal conectado en Y sumergido en hielo.

Se obtienen de 1-3 ml de muestra tras un tiempo de recogida de aproximadamente 15 minutos. En el condensado del aire exhalado se mide pH inmediatamente tras su recogida (ABL 88 Flex apparatus Radiometer, Copenhague, Dinamarca). La muestra se reparte en alícuotas de 0,4ml para su congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posterior análisis.



**Figura 21:** Representación esquemática del dispositivo para recogida de CAE

En la siguiente figura, se esquematizan los tiempos de recogida de las muestras de CAE



**Figura 22: Tiempos de recogida de CAE**

*VBP: ventilación bipulmonar, VUP: ventilación unipulmonar, VE: ventilación espontánea*  
*I: isquemia, R reperfusión*

## 8. Medición de marcadores de estrés oxidativo

El procesado y análisis bioquímico de las muestras se realizan en el laboratorio del Hospital Clínico Universitario. Las muestras de CAE y sanguíneas previamente congeladas se descongelan para su tratamiento y análisis.

### 8.1 DETERMINACIÓN DE 8-ISOPROSTANO (8-iso PGF<sub>2α</sub>)

El 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, es un producto muy estable procedente de la degradación del ácido araquidónico, por acción de los RLO (177). La determinación se realiza por inmunoensayo competitivo enzimático mediante un kit que permite cuantificar 8-

isoprostanos en plasma, suero, sangre completa, sobrenadante de cultivos celulares y otras muestras. Como la mayoría del 8-iso-PGF $2\alpha$  en plasma está en forma esterificada con fosfolípidos, la determinación de los niveles plasmáticos de 8-iso-PGF $2\alpha$ , requiere una hidrólisis alcalina previa al inmunoensayo.

Se utilizó el kit de enzimoimmunoanálisis denominado 8-Isoprostane EIA Kit de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Este ensayo se basa en la competición entre el 8-isoprostano libre del suero y el trazador de 8-isoprostano (conjugado de 8-isoprostano con Acetilcolinesterasa o AcCh) por un número limitado de puntos de unión de anticuerpos policlonales de conejo específicos anti 8-isoprostano. Como la concentración del trazador de 8-isoprostano se mantiene constante mientras la concentración de 8-isoprostano es variable, la concentración del trazador disponible para unirse al anticuerpo de conejo es inversamente proporcional a la concentración de 8-isoprostano en el pocillo.

Los pasos del ensayo son los siguientes:

1. Cada pocillo está recubierto previamente de anticuerpos monoclonales de ratón anti IgG de conejo y proteínas bloqueantes para evitar uniones inespecíficas.
2. Se añaden la muestra (isoprostanos libres) y trazador (anticuerpos policlonales anti 8-isoprostano de conejo unidos a AcCh). Tanto el 8-isoprostano libre como los unidos al trazador se unen a los anticuerpos monoclonales anti IgG de conejo.
3. La placa se lava para eliminar los reactivos no unidos.
4. El reactivo de Ellman se añade al pocillo como sustrato de la enzima AcCh. Este reactivo contiene ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) y acetilcolina. El producto de esta reacción enzimática (tiocolina) tiene un marcado color amarillo y absorbe intensamente a una longitud de onda de 412 nm. La intensidad de este color, determinada por espectrofotometría, es proporcional a la cantidad de trazador de 8-isoprostano unido al pocillo que, a su vez, es inversamente proporcional a la cantidad de 8-isoprostano libre presente en el pocillo durante la incubación.

absorbancia  $\propto$  trazador de 8-isoprostano unido  $1/\propto$  8-isoprostano

### Preparación de los reactivos

El kit contiene los siguientes reactivos:

- Tampones:
  - Concentrado de tampón TRIS (hidroximetil aminometano)
  - Concentrado de tampón de lavado de Acetilcolinesterasa
  - Tampón DEA (dietanolamina)
- Anticuerpos policlonales de conejo anti-8-isoprostano
- Trazador 8-isoprostano-AcCh
- Estándares de 8-isoprostano
- Placa de 96 pocillos cubiertos con anticuerpos de ratón anti-IgG de conejo
- Reactivo de Ellman

### Análisis

- I. Se preparan los reactivos
- II. Se preparan los estándares de 8-isoprostano mediante diluciones seriadas

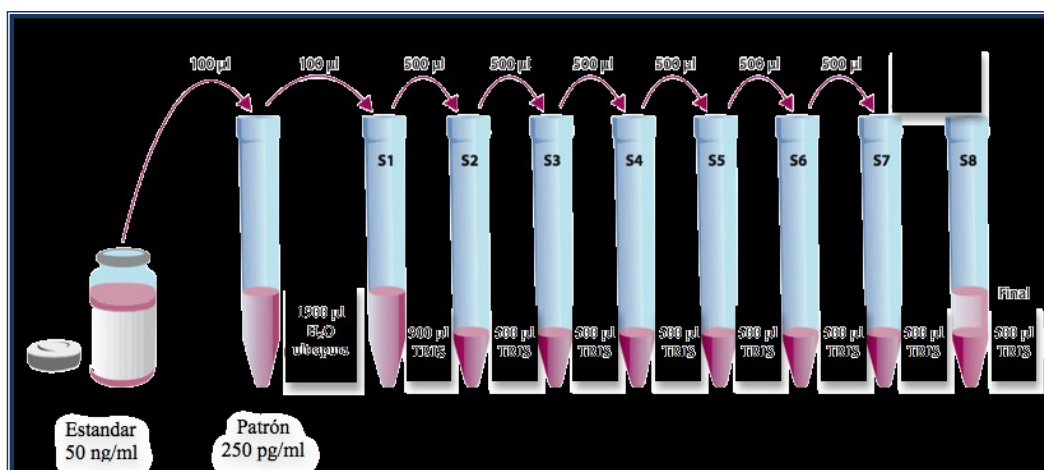
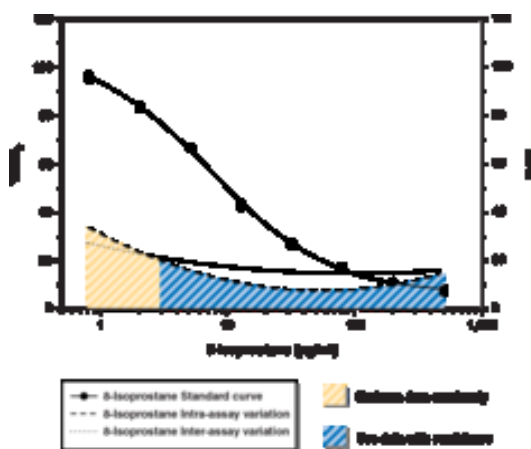


Figura 23: Descripción gráfica de la preparación de los estándares de 8-isoprostano.

- III. Preparación de la placa de 96 pocillos
- IV. Incubar en oscuridad y agitando durante 90 minutos.
- V. Análisis de la muestra
- VI. Leer a una longitud de onda de 405 nm. Antes de la lectura de cada placa, es importante eliminar posibles huellas o suciedad , que pudieran alterar la lectura de las absorbancias.

**Cálculo de los resultados.**

Una vez hecha la lectura de las placas, se calcula el promedio de los valores de las absorbancias de cada medida, tanto de los estándares como de las muestras, dado que todo se analiza por duplicado. Con las absorbancias de los estándares y sus respectivas concentraciones se traza una curva de regresión colocando en el eje de ordenadas la concentración y en el eje de abscisas las absorbancias.



**Figura 24: Curva estándar para 8-isoprostano.**



## 8.2 DETERMINACIÓN DE NITRITOS/NITRATOS

Los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) son productos finales de la oxidación del óxido nítrico *in vivo* que se producen en una proporción variable y difícilmente predecible. La suma de ambos productos supone el mejor índice para valorar la producción total de óxido nítrico.

Para medir los nitritos y los nitratos en el plasma de las muestras obtenidas de plasma y CAE usamos el kit colorimétrico de nitritos/nitratos de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Este ensayo supone un método preciso y práctico para medir la concentración total de nitritos/nitratos en un proceso simple de dos pasos:

- 1.- La conversión de nitratos a nitritos utilizando la enzima nitrato reductasa.
- 2.- La conversión de los nitritos en un compuesto azo púrpura intenso al añadir los reactivos de Griess (sulfanilamida y etilendiamina). La medida mediante fotometría de la absorbancia debida a este cromóforo azo determina con precisión la concentración de nitritos.

### Preparación de los reactivos

El kit contiene los siguientes reactivos:

- Tampón de ensayo nitritos/nitratos
- Preparado de la enzima nitrato reductasa
- Preparado de cofactor de la enzima nitrato reductasa
- Estándar de nitratos
- Estándar de nitritos
- Reactivo R1 de Griess (sulfanilamida)
- Reactivo R2 de Griess (etilendiamina)
- Placa de 96 pocillos

## **Análisis**

- I. Se preparan los reactivos.
- II. Los reactivos de Griess ya vienen listos para su uso en el kit.
- III. Reconstituir el preparado de nitrato reductasa con 1,2 mL de tampón.  
Este reactivo se debe mantener en hielo durante su uso.
- IV. Reconstituir el preparado de cofactor de nitrato reductasa con 1,2 mL de tampón. Este reactivo se debe mantener en hielo durante su uso.
- V. Se preparan los estándares y el patrón.
- VI. Una vez descongeladas las muestras (sin diluir) y preparados los reactivos se disponen en las placas.
- VII. Leer a los 10 minutos a una longitud de onda de 492 nm.

## **Cálculo de los resultados.**

Es necesario designar al menos dos pocillos como “blancos” de absorbancia, conteniendo únicamente 200  $\mu$ L de tampón. La absorbancia de estos pocillos (“blancos”) debe sustraerse de la absorbancia medida en el resto de los pocillos. Del mismo modo deben incluirse los estándares para la curva de nitritos más nitratos. Para medir nitratos más nitritos sólo se requiere la curva estándar de los nitratos. El resto de los pocillos de la placa se utilizan para analizar las muestras.

Se debe realizar el promedio de los valores de absorbancia obtenidos de los pocillos "blancos" y restárselo a los valores de absorbancia del resto de los pocillos. Se traza una curva con las absorbancias a 492 nm como una función de la concentración de nitratos o nitritos. Para determinar la concentración total de nitritos más nitratos se utiliza la curva estándar de nitratos, mientras que la curva estándar de nitritos se usa únicamente para determinar la concentración de nitritos.

Una vez hecha la lectura de las placas, se calcula el promedio de los valores de las absorbancias de cada medida, tanto de los estándares como de las muestras, dado que todo se analiza por duplicado. Con las absorbancias de los estándares y sus respectivas concentraciones se traza una curva de regresión colocando en el eje de ordenadas la concentración y en el eje de abscisas las absorbancias.

### 8.3 DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El  $H_2O_2$  es muy inestable en el CAE. Así pues, tras la recogida de las muestras, las alícuotas se congelan inmediatamente a  $-80^{\circ}C$  hasta su posterior análisis (146), que se realiza en la semana siguiente a la recogida. Los niveles de  $H_2O_2$  se determinan mediante la oxidación del ion ferroso a férrico por el peróxido de hidrógeno en condiciones de acidosis. El ion férrico se une al colorante naranja de xylenol para formar un compuesto estable, medible por colorimetría a 595nm (*colorimetric assay kit, Cayman Chemical Co*)

### 8.4 DETERMINACIÓN DE pH en CAE

El pH se mide mediante el analizador ABL 88 Flex apparatus Radiometer (Copenhague, Dinamarca). Con el fin de eliminar el  $CO_2$  del CAE se hace burbujear Argón en la muestra a 300ml/min durante 10 minutos, previamente a la determinación.

## 9. Análisis estadístico

El análisis de datos realizado en el presente estudio se basa, por una parte, en la descripción de las variables, y por otra, en la realización de contraste de hipótesis.

### Para la descripción de las variables,

En caso de variables numéricas: su descripción se efectúa a través del cálculo de medidas de tendencia central o de posición, como la media aritmética o la mediana, y medidas de dispersión, como la desviación típica (DE) o el rango intercuartílico (RQ), e indicando el número de observaciones, en caso de las variables continuas.

En caso de variables categóricas o cualitativas su descripción se realiza mediante frecuencias absolutas (número de casos) y relativas (porcentajes).

Para el análisis de la **normalidad** de las variables se ha considerado el test de Shaphiro-Wilk

Además del análisis descriptivo, se han desarrollado **contrastos de hipótesis**.

Previamente a las pruebas de comparación de medias, se realizaron pruebas de homogeneidad de las varianzas (Prueba de Levene). En caso de 8-isoprostano medido en CAE, la prueba de Levene para T1 resultó menor de  $p < 0.05$ . Para este caso, se realizó un diagrama de cajas y bigotes detectando 4 casos atípicos de nivel superior. Estos casos fueron eliminados del estudio, para que se cumpliera la homogeneidad de varianzas (Prueba de Levene,  $p > 0.05$ ).

Para el contraste paramétrico, el test utilizado ha sido el t-student para muestras independientes.

Para el análisis de la posible asociación, o dependencia, entre variables cualitativas o categóricas, en el contraste de hipótesis no paramétrico, se ha empleado el test  $\chi^2$  de Independencia de variables.

Se han establecido correlaciones entre el tiempo total de ventilación unipulmonar y los múltiples marcadores de estrés oxidativo (8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el pH en el CAE y en el plasma mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r).

El nivel de significación aceptado ha sido del 95%. De esta manera, si el p-valor asociado al contraste es menor de 0,05, se aceptará la significatividad del contraste.

Previamente al estudio se calculó el **tamaño de la muestra** adecuado considerando como variable el parámetro 8-isoprostano (en CAE). En primer lugar se calcularon en 2 grupos de 10 pacientes cada uno, las medias aritméticas (Control: 58.36; RIPC: 38,38 pg/ml) y seguidamente se ponderó la desviación típica de ambos grupos experimentales (control vs. RIPC) para el parámetro 8-isoprostano (en CAE) en el tiempo T2, obteniendo una desviación conjunta (27.88 pg/ml). Con los datos obtuvimos que

para un riesgo  $p < 0.05$  y una potencia estadística de 80% era necesario un tamaño muestral de 25 pacientes por cada grupo. En previsión de posibles pérdidas postaleatorización, se decidió incluir hasta 27 pacientes en cada grupo (10% adicional).

Los datos fueron recogidos en un cuaderno de recogida de datos para cada paciente. Dichos datos fueron transferidos a una hoja de datos del programa informático SPSS para Windows (*Statistical Package for the Social Sciences*, SPSS, Chicago, USA; versión 15.0).



**CAPÍTULO III**

**RESULTADOS**

**DESARROLLO ARGUMENTAL**





## 1. RESULTADOS

### 1.1 Descripción de la muestra

Fueron elegidos 54 pacientes, de los cuales 53 fueron randomizados al grupo RIPC (n= 26) o al grupo control (n=27). En un paciente finalmente se suspendió la intervención por cambio en la programación. Los 53 pacientes completaron el estudio y fueron incluidos en el análisis de datos.

No hubo dificultad con ningún paciente para mantener el aislamiento bronquial con el tubo de doble luz. Ningún paciente precisó ventilación bipulmonar intermitente para mantener la oxigenación adecuada durante la cirugía. Tampoco se precisó transfundir a ningún paciente y todos pudieron extubarse al final del procedimiento, después de recogida de agua exhalada en T3. Asimismo, la analgesia epidural fue efectiva en todos los pacientes.

Las características basales de los pacientes se resumen en la tabla 4. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, para ninguna de las variables que se examinan.

Tabla 4: Características basales de los pacientes

	Grupo RIPC	Grupo control	Valor p
<b>Edad (años)</b>	66.7 ± 8.3	66.3 ± 11.4	0.885
<b>Genero (hombres)</b>	20	19	0.819
<b>Peso (kg)</b>	76.9 ± 11.7	74.9 ± 8.2	0.465
<b>Fumadores activos (n)</b>	10	12	0.871
<b>Ex-fumadores (n)</b>	13	11	0.688
<b>Nunca fumadores (n)</b>	3	4	0.725
<b>Comorbilidad (n)</b>			
EPOC	7	5	0.687
HTA	7	7	0.934
Cardiopatía isquémica	3	2	0.529
DM tipo2	4	4	0.954
I Renal crónica	1	1	0.978
<b>FEV<sub>1</sub> Preoperatorio (l)</b>	2.04± 0.57	2.08 ± 0.59	0.815
<b>FVC Preoperatorio (l)</b>	2.77± 0.52	2.75 ± 0.60	0.899
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC</b>	0.74 ± 0.13	0.76 ± 0.14	0.631
<b>Pulmon (derecho)</b>	19	13	0.116
<b>Histología (n)</b>			
Adenocarcinoma	9	14	0.323
Carcinoma escamoso	10	9	0.918
Otros	7	4	0.455
<b>VUP (min)</b>	127 ± 55	113 ± 48	0.318
<b>Tiempo quirúrgico (min)</b>	164 ± 49	180 ± 57	0.281
<b>Fluidoterapia intraop (l)</b>	1.37 ± 0.34	1.33 ± 0.33	0.639
<b>Diuresis intraop (l)</b>	0.47 ± 0.09	0.51 ± 0.11	0.156

Valores expresados como media ± DE. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica. HTA: hipertensión arterial, DM: diabetes Mellitus, FEV1: Volumen espiratorio forzado en un segundo, FVC: capacidad vital forzada

**Tabla 5: Datos hemodinámicos y parámetros sanguíneos durante los tiempos del estudio**

	T0	T1	T2	T3	T4	T5
<b>FC</b>						
Control	75±10	80±11	81±12	80±11	81±12	81±12
RIPC	74±9	79±9	78±10	79±11	80±12	80±11
<b>MAP</b>						
Control	77±14	75±12	76±11	80±13	83±13	82±14
RIPC	77±13	76±11	79±12	80±8	82±10	78±12
<b>Hb (g/dl)</b>						
Control	13.2±1.1	12.9±1.2	12.7±1.1	12.8±0.9	12.6±1.1*	12.4±1.2*
RIPC	13.3±1.7	13.2±2.0	12.8±2.1	12.8±2.3	12.2±2.2*	12.0±2.3*
<b>Lactato</b>						
Control	1.10±0.36	1.11±0.26	1.44±0.48**	1.36± 0.59	1.45±0.90	1.33±0.85
RIPC	1.25±0.43	1.23±0.49	1.35±0.50	1.25± 0.57	1.44±0.66	1.26±0.48
<b>pH</b>						
Control	7.40±0.05	7.38±0.03	7.37±0.04	7.38± 0.05	7.38±0.04	7.39±0.04
RIPC	7.39±0.06	7.38±0.04	7.38±0.03	7.36± 0.06	7.38±0.03	7.39±0.04
<b>PaCO<sub>2</sub></b>						
Control	38 ± 4	40 ± 4	38 ± 6	39± 4	40 ± 5	42 ± 5*
RIPC	38 ± 5	41 ± 6	38 ± 3	38 ± 4	41 ± 4	42 ± 4*
<b>PaO<sub>2</sub></b>						
Control	218±99	113±57***	238±93	164±54*	140±49**	119±33***
RIPC	237±107	125±67**	254±92	212±70 <sup>#</sup>	171±36* <sup>#</sup>	145±42* <sup>#</sup>
<b>PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub></b>						
Control	398±132	163±71***	367±115	328±109	284±96**	247±73***
RIPC	377±84	184±91***	390±94	405±139 <sup>#</sup>	350±77 <sup>#</sup>	305±96* <sup>#</sup>

Valores expresados como media ± SD (Grupo control n=27, RIPC n=26)

RIPC: precondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión, FC: frecuencia cardiaca,

MAP: presión arterial media, Hb: hemoglobina,

Diferencias estadísticas T1-T4 vs T0 : \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

Diferencias estadísticas RIPC vs control: <sup>#</sup> P<0.05, <sup>##</sup> P<0.01 ; <sup>###</sup> P<0.001

Como se muestra en la tabla 5, las variables hemodinámicas y el pH fueron similares en ambos grupos, en todos los tiempos del estudio ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, los valores de  $PaO_2$  y en el cociente  $PaO_2/FiO_2$  disminuyen significativamente en T1 durante el colapso pulmonar y luego aumentan significativamente en T3-T5 tras la reexpansión pulmonar. Destaca sin embargo, la diferencias encontradas en las cifras de  $PaO_2$  y en el cociente  $PaO_2/FiO_2$  donde el grupo de intervención (RIPC) fue significativamente mayor que la del grupo control en T3, a los 120 minutos tras reestablecerse la ventilación bipulmonar), en T4 (a las 8h) y T5 (a las 18h post cirugía ( $p < 0.05$  en los tres tiempos).

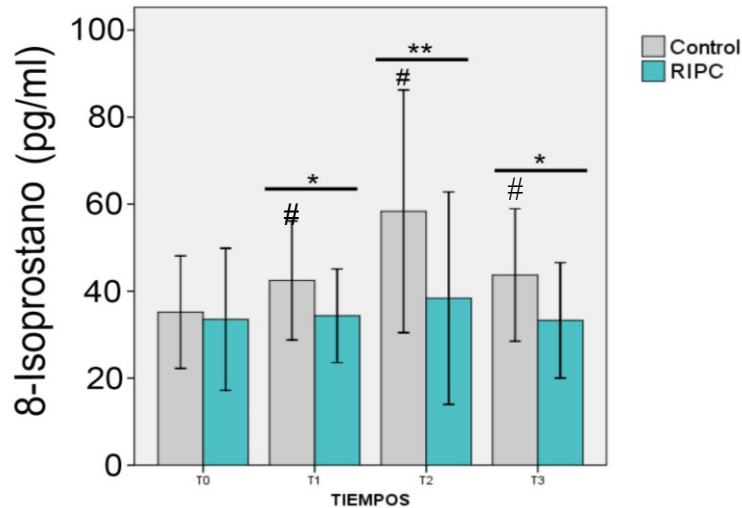
En el resto de parámetros analizados, no se encontraron diferencias entre los grupos RIPC y control.

## 1.2 Preacondicionamiento remoto y estrés oxidativo

Se resumen a continuación los resultados de la evolución temporal (( $T_0$  vs.  $T_1$ - $T_4$ ) de los marcadores de estrés oxidativo y pH en las muestras de CAE tanto en el grupo control ( $n=27$ ) como en el grupo RIPC 8 ( $n=26$ ).

### 1.2.1 RESULTADOS EN CAE

### 1.2.1.1 Evolución de los valores de 8- isoprostano a lo largo del tiempo para cada uno de los grupos.

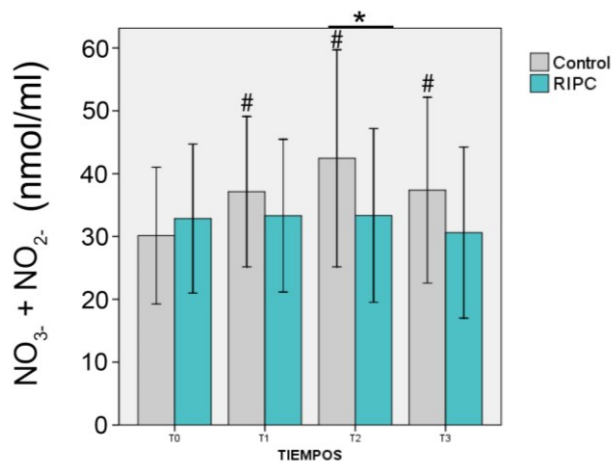


Diferencias estadísticas  $T_1$ - $T_3$  vs  $T_0$  en el grupo control : #  $P < 0.05$

Diferencias estadísticas RIPC vs control: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$

Los resultados de la concentración de isoprostano en CAE muestran una evolución significativamente distinta para ambos grupos. En el grupo control, se observa un ascenso de la concentración de 8-isoprostano a lo largo del tiempo quirúrgico ( $T_1$ - $T_3$ ), especialmente en  $T_2$  durante la reperfusión ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$ ). Sin embargo, en el grupo RIPC, los niveles son prácticamente estables en el tiempo, similar a los niveles basales. En cada uno de los tiempos del estudio, los niveles de 8-isoprostano son mayores en el grupo control que en grupo RIPC, alcanzando significación estadística en los tiempos de medición  $T_1$ - $T_3$  ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$ ).

1.2.1.2 Evolución de los valores de nitritos a lo largo del tiempo para cada uno de los grupos.



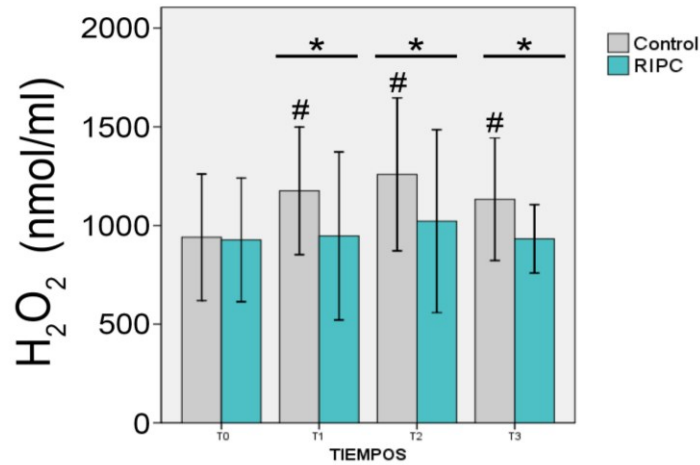
Diferencias estadísticas T<sub>1</sub>-T<sub>3</sub> vs T<sub>0</sub> en el grupo control: <sup>#</sup> P<0.05

Diferencias estadísticas RIPC vs control: \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001

Como se observa en la figura, la concentración de nitritos+nitratos, también aumenta en T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> en el grupo control (p<0.01, p<0.001 and p<0.05 respectivamente). En el grupo RIPC, hay un incremento significativo (p<0.05), solo en T<sub>1</sub> durante la VUP.

Cuando se comparan ambos grupos, los niveles de nitritos+nitratos son significativamente mayores en el grupo control, respecto al grupo RIPC, en T<sub>2</sub> (p<0.05).

### 1.2.1.3 Evolución de los valores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a lo largo del tiempo para cada uno de los grupos



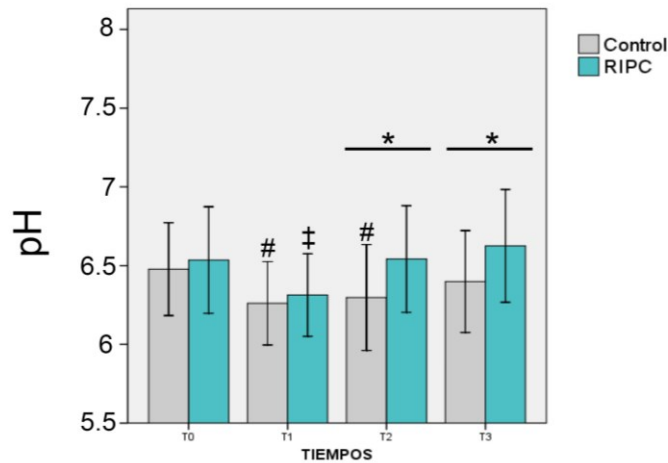
Diferencias estadísticas T<sub>1</sub>-T<sub>3</sub> vs T<sub>0</sub> en el grupo control : # P<0.05

Diferencias estadísticas RIPC vs control: \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001

En el caso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observan niveles mayores en el grupo control durante todos los tiempos cuando se comparan con los niveles basales (T<sub>0</sub> vs. T<sub>1</sub>-T<sub>3</sub>) T<sub>1</sub> p<0.05; T<sub>2</sub> p<0.01; T<sub>3</sub> p<0.05. Sin embargo en el grupo RIPC, no hay diferencias significativas.

Cuando se comparan ambos grupos, se observan niveles mayores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el grupo control de T<sub>1</sub>-T<sub>3</sub> (todas p<0.05).

1.2.1.4 Evolución de los valores de pH a lo largo del tiempo para cada uno de los grupos



*Diferencias estadísticas T<sub>1</sub>-T<sub>3</sub> vs T<sub>0</sub> en el grupo control : # P<0.05*

*Diferencias estadísticas T<sub>1</sub>-T<sub>3</sub> vs T<sub>0</sub> en el grupo RIPC: ‡ P<0.05*

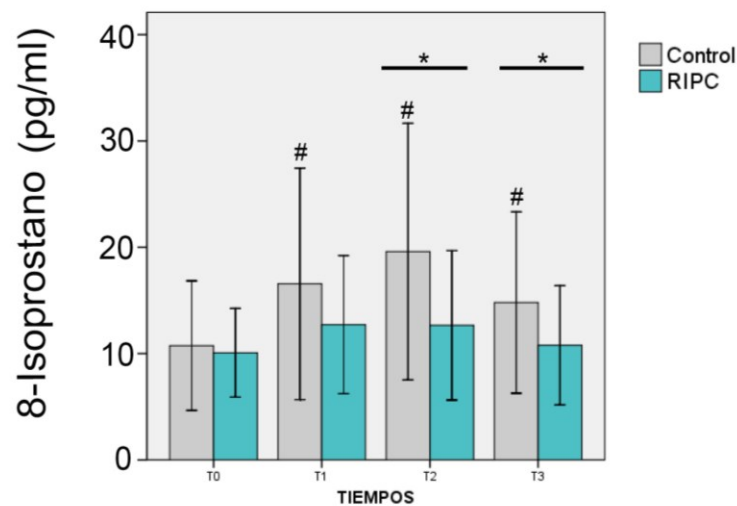
*Diferencias estadísticas RIPC vs control: \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001*

Respecto a los valores de pH, destaca un marcado descenso en el periodo de VUP (T1) respecto a T0, estadísticamente significativo para ambos grupos (p =0.006 grupo control, y p=0,012 grupo RIPC) así como durante la reexpansión pulmonar (T2) en el grupo control (p<0,05). En la comparación intergrupo, se observan también diferencias significativas en T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> (p<0,05).



## 1.2.2 RESULTADOS EN PLASMA

### 1.2.2.1 Evolución de los valores 8-isoprostano a lo largo del tiempo para cada uno de los grupos



*Diferencias estadísticas T<sub>1</sub>-T<sub>3</sub> vs T<sub>0</sub> en el grupo control : # P<0.05*

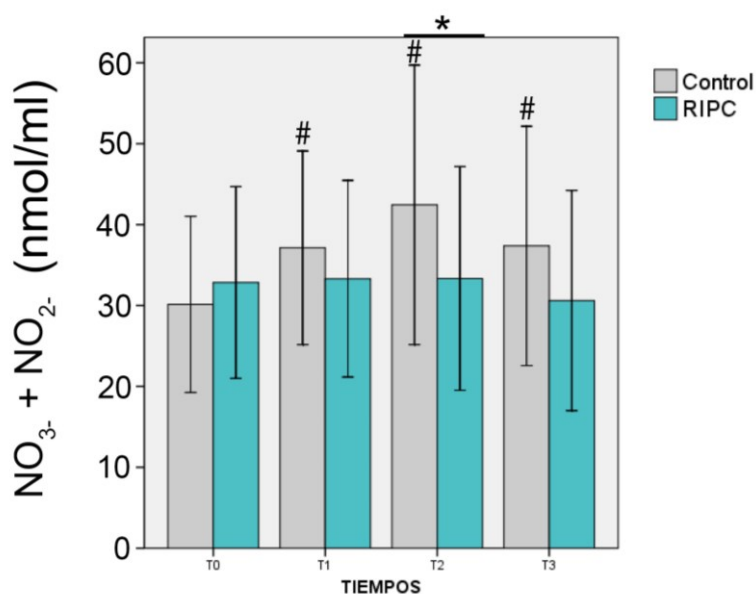
*Diferencias estadísticas RIPC vs control: \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001*

En cuanto al comportamiento de los isoprostanos en sangre, destaca la similitud con el observado en CAE. Mientras los niveles en el grupo control aumentan en todos los tiempos respecto a T<sub>0</sub>, de forma significativa (p= 0,019 en T<sub>1</sub>, p=0,001 en T<sub>2</sub>, p=0,049 en T<sub>3</sub>), los niveles en el grupo RIPC se mantienen estables. En los tiempos T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, las diferencias entre ambos grupos son significativas (p=0,014 en T<sub>2</sub> y p=0,048 en T<sub>3</sub>).

**Tabla 6: valores de isoprostanos (pg/ml) en plasma y CAE, en el grupo control.**

	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
ISO PLASMA	10,7	16,5	19,5	14,8
ISO CAE	35,1	49,6	58,3	43,7

**1.2.2.2 Evolución de los valores de nitritos/nitratos a lo largo del tiempo para cada uno de los grupos**



*Diferencias estadísticas T<sub>1</sub>-T<sub>3</sub> vs T<sub>0</sub> en el grupo control : # P<0.05;*

*Diferencias estadísticas RIPC vs control: \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001*

Como se observa en la figura, la concentración de nitritos+nitratos, también aumenta en T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> en el grupo control (p<0.05). En el grupo RIPC, no hay un incremento significativo a lo largo del estudio.

Cuando se comparan ambos grupos, los niveles de nitritos+nitratos son significativamente mayores en el grupo control, respecto al grupo RIPC, en T<sub>2</sub> (p<0.05).

**Tabla 7: Valores de Nitritos/nitratos (mmol/ml) en plasma y CAE, en el grupo control**

	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
N PLASMA	30,1	37,1	42,4	37,3
N CAE	11,5	17,6	22,9	15,5

### 1.2.3 RESULTADOS CLÍNICOS

#### 1. ARDS

- A las 18 horas tras la reanudación de la VBP (T<sub>5</sub>), durante la estancia en la unidad de Reanimación, 8 pacientes (14.8%) mostraron valores de PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> <200.
- En todos ellos se encontraron infiltrados radiológicos pulmonares en mayor o menor grado en el pulmón intervenido.
- No se encontraron diferencias para esta complicación entre el grupo control y el grupo RIPC (p>0,05)
- 1 paciente del grupo control falleció durante su estancia en Reanimación.

#### 2. Fibrilación auricular

Un total de 11 pacientes (20,7%) presentaron fibrilación auricular de nueva aparición en el postoperatorio inmediato. 6 Pacientes en el grupo control, y 5 en el grupo RIPC (p>0,05).

## 1.2.4 TIEMPO DE VUP Y ESTRÉS OXIDATIVO

Tabla 8: Correlación entre los tiempos de VUP y marcadores de estrés oxidativo

## 8.A: resultados en CAE

CAE	T1		T2	
	r	p	r	p
8-isoprostane (pg/ml)				
Control	0.4979	0.0070	0.5329	0.0035
RIPC	0.0848	0.6734	0.3437	0.0792
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml))				
Control	0.4029	0.0335	0.4273	0.0233
RIPC	0.3161	0.1082	0.3431	0.0798
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/ml)				
Control	0.3965	0.0367	0.4695	0.0117
RIPC	0.2038	0.3074	0.3519	0.0718
pH				
Control	-0.4315	0.0219	-0.3897	0.0404
RIPC	-0.1529	0.4461	-0.0955	0.6356

*Coefficiente de correlación de Pearson (r) entre el tiempo de VUP (minutos) y los marcadores de estrés oxidativo y pH en CAE. Grupo control (n=27); grupo RIPC (n=26)  
RIPC: preacondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión.*

**8.B: resultados en plasma**

PLASMA	T1		T2	
Valor	r	p	r	p
8-isoprostane (pg/ml)				
Control	0.4525	0.0156	0.3567	0.0622
RIPC	0.0197	0.3239	0.1854	0.3545
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml)				
Control	0.4432	0.0182	0.2772	0.1533
RIPC	0.0034	0.9866	0.0224	0.9117

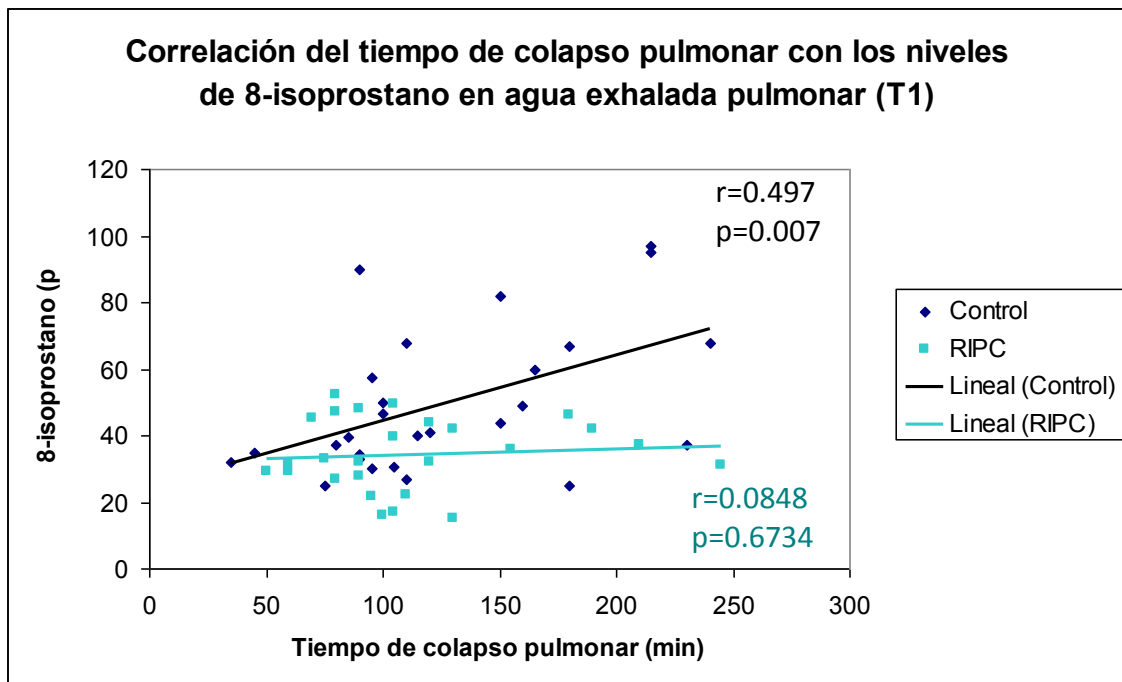
*Coefficiente de correlación de Pearson (r) entre el tiempo de VUP (minutos) y los marcadores de estrés oxidativo en plasma. Grupo control (n=27); grupo RIPC (n=26)*  
*RIPC: preacondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión.*

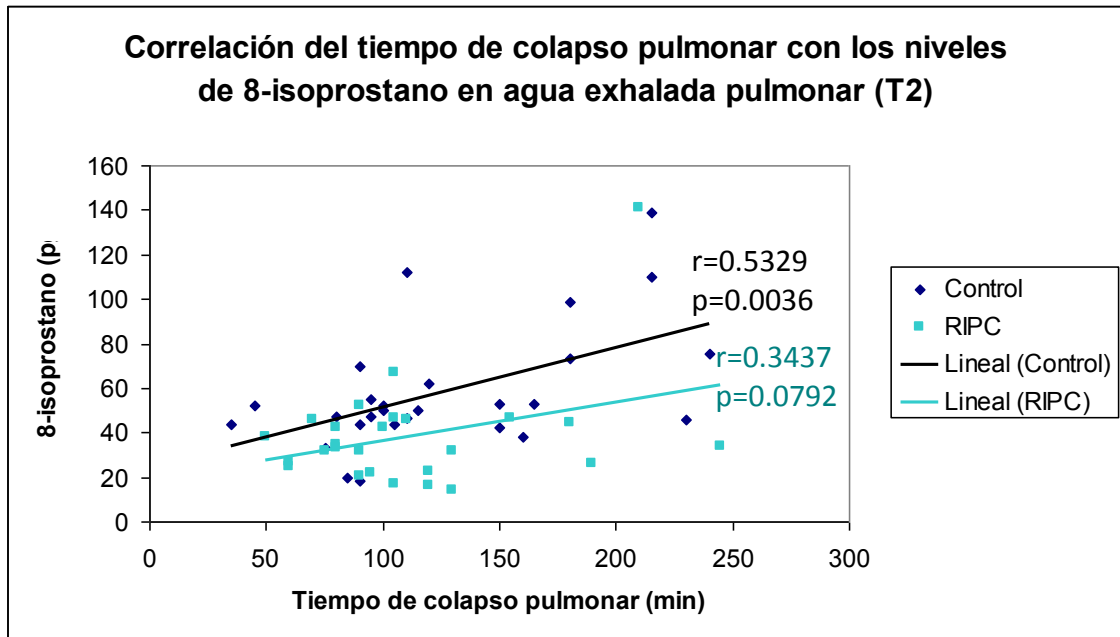
Las tablas muestran en el grupo control y en el grupo intervención RIPC, los valores de correlación entre el tiempo de colapso pulmonar o VUP y los marcadores de estrés oxidativo, en dos tiempos T<sub>1</sub>, durante el colapso pulmonar y en T<sub>2</sub> durante la reexpansión/reperfusión pulmonar. En la tabla A, en muestras de CAE, en el grupo control existe una correlación positiva entre los marcadores y el tiempo de VUP, estadísticamente significativa, en ambos tiempos. La correlación es más fuerte para el 8-isoprostano (p <0.01) en ambos tiempos de medida. En el grupo RIPC no se observa correlación estadísticamente significativa para ningún marcador y en ningún tiempo. Los valores de pH muestran una correlación inversa (negativa) significativa para el grupo control en ambos tiempos de estudio.

En la tabla B se muestran los valores de correlación en plasma. Sólo se observa correlación directa entre el tiempo de VUP y los marcadores de estrés oxidativo, en T<sub>1</sub>, para el grupo control. En el grupo intervención, RIPC no existe correlación para ninguno de los tiempos de medida

**Figura 25: Correlación entre el tiempo de VUP y 8-isoprostano en CAE**

**25.A Correlación en T<sub>1</sub>**



25.B Correlación en T<sub>2</sub>

La figura muestra, en CAE, una correlación directa entre el tiempo de colapso pulmonar (minutos) y los niveles de 8-isoprostano del grupo control en T<sub>1</sub>, durante la VUP. Dicha correlación es mayor durante el periodo de reexpansión pulmonar, T<sub>2</sub> ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, en el grupo RIPC no existe correlación para ninguno de los tiempos.

## 2. DESARROLLO ARGUMENTAL

Se desprende de los resultados obtenidos, que el durante la cirugía de pulmón con lobectomía pulmonar, se produce un daño oxidativo que se inicia en T1 durante el colapso pulmonar y se amplifica durante la reexpansión pulmonar y posteriormente. Y que el preconditionamiento remoto por isquemia-reperfusión, protege frente al estrés oxidativo en la cirugía de lobectomía pulmonar.

El presente estudio valora el efecto del RIPC a nivel pulmonar, en pacientes sometidos a lobectomía. En este tipo de cirugía se produce lesión pulmonar de origen multifactorial: tejido neoplásico, manipulación quirúrgica y ventilación mecánica. Pero sobretodo, es un modelo de IR debido al colapso y reexpansión pulmonar por la necesidad de VPS.

En la lesión tisular por la IR juega un papel central el estrés oxidativo, un desbalance entre los radicales libres y los agentes antioxidantes, que de mantenerse en el tiempo, conduce a la muerte celular. Los RLO aumentan de manera marcada tras reestablecerse el flujo sanguíneo, condicionando entre otros, la lipoperoxidación de los ácidos grasos de las membranas celulares.

La cuantificación pues del estrés oxidativo, es de gran interés para el estudio del fenómeno de isquemia-reperfusión, así como para valorar nuevas intervenciones, como el preconditionamiento remoto, que pueden modificar el grado de daño oxidativo.



## 2.1 Preacondicionamiento remoto y estrés oxidativo

Al igual que se han expuesto los resultados, distinguimos entre los hallazgos en CAE y en plasma.

### 2.1.1 PREACONDICIONAMIENTO REMOTO Y MARCADORES EN CAE

Una de las características diferenciales de esta tesis con respecto a trabajos que están en la misma línea, es la recogida simultánea de CAE procedente del árbol bronquial y muestra sanguínea, con el fin de valorar el grado de estrés oxidativo debido a la cirugía directamente en la vía aérea.

En relación al **objetivo principal** del presente trabajo, el comportamiento del estrés oxidativo pulmonar en pacientes sometidos a RIPC en comparación con controles, nuestros resultados muestran una gran diferencia entre los grupos.

El resultado más relevante es el aumento en el grupo control de 8-isoprostano, producto *in vivo* de la peroxidación del ácido araquidónico, de T<sub>1</sub>-T<sub>3</sub>, especialmente en T<sub>2</sub> (P< 0.05), a diferencia de lo que sucede en el grupo RIPC, en el que las concentraciones de 8-isoprostano se mantienen estables. Las diferencias entre ambos grupos son estadísticamente significativas en todos los tiempos de medida (p<0.01; p<0.001; p<0.05 T<sub>1</sub>-T<sub>3</sub> respectivamente).

Estos hallazgos indicarían un daño oxidativo por RLO, que se inicia durante el periodo de isquemia, en T<sub>1</sub>, para aumentar rápidamente en T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, durante la reexpansión pulmonar. Este patrón temporal ya fue descrito en 1979 por Fridovich, que sugirió que el daño tisular por la isquemia, de hecho se iniciaba tras la reperusión, por la generación en de RLO (178).

Nuestros resultados respaldan el papel protector del preacondicionamiento remoto por isquemia-reperusión, frente al daño oxidativo pulmonar causado durante la cirugía de resección tumoral con VUP .

El concepto de preacondicionamiento remoto por isquemia reperusión (RIPC) fue introducido en por Przyklenk al lograr “acondicionar” un lecho vascular induciendo isquemia en otro territorio a distancia. Paradójicamente, un periodo breve de isquemia parece preparar a los tejidos frente a insultos isquémicos de mayor entidad. A pesar de que el mecanismo exacto por el cual el RIPC confiere protección tisular no ha sido dilucidado completamente. Por ser un método sencillo en su aplicación, no invasivo y sin efectos adversos graves conocidos, se ha ido ensayando en múltiples órganos con el fin de valorar su posible efecto protector frente al daño inducido por la isquemia y posterior reperusión. El corazón es el órgano en el que más ampliamente se ha estudiado el RIPC como mecanismo protector frente al fenómeno de IR. Aunque hay algunos estudios en los que no se ha podido demostrar un efecto cardioprotector para el preacondicionamiento remoto (179-181), en la mayoría de los trabajos (182) se observa una mejoría atribuible al RIPC, tanto en pacientes con infarto de miocardio (183) como en pacientes a los que se realiza angioplastia de forma electiva (111), pero también en los pacientes sometidos a cirugía cardiaca (111, 115), coronaria y valvular.

A pesar de toda esta evidencia en el estudio del preacondicionamiento cardiaco, un reciente metaanálisis concluye que el RIPC no es un método que haya demostrado mejorar los resultados clínicos, a saber: muerte, IAM preoperatorio, fracaso renal, ictus, isquemia mesentérica, tiempo de estancia en unidades de críticos o estancia hospitalaria (184). Las posibles razones que se esgrimen para esta aparente contradicción hacen referencia sobretudo a la heterogeneidad de pacientes, patología de base, situación en la que se aplica el preacondicionamiento y enfermedades concomitantes como cardiopatía isquémica o diabetes. Además, en los estudios realizados en el ámbito quirúrgico, influye en los resultados el régimen anestésico empleado (especialmente el uso de propofol) así como la solución de cardioplejia.

El estudio del efecto del preacondicionamiento remoto en la fisiopatología pulmonar, está mucho menos documentado y en casi todos los trabajos en humanos, se plantea como un objetivo secundario. A nivel experimental, se ha descrito el efecto protector del preacondicionamiento isquémico mediante el análisis de MDA y el consumo de glutathion en modelo porcino (185). Olguner et al (186), concluyen que el

preacondicionamiento remoto inhibe la peroxidación lipídica así como el daño histológico y la apoptosis renal y pulmonar, en un modelo experimental de sepsis en ratas. Y Harkin et al (187), también objetivan un descenso en la interleucina-6, edema pulmonar y fallo respiratorio en un modelo porcino de IR, atribuible a RIPC. En humanos, el grupo de Li et al(188), concluye que el preacondicionamiento remoto protege del daño pulmonar en pacientes intervenidos de aneurisma de aorta abdominal de forma programada. Estos autores analizan el estado de oxigenación mediante la diferencia alveolo-arterial de oxígeno (A-aDO<sub>2</sub>) que es significativamente mayor en el grupo control. En cuanto al estudio del estrés oxidativo, analizan de forma secundaria los niveles de MDA en ambos grupos. Este marcador de lipoperoxidación aumenta con respecto a los niveles basales a lo largo de las 24 horas posteriores a la intervención, siendo los niveles significativamente más elevados a las 8 y a las 12 horas en el grupo control. Estos resultados, una vez más reforzarían la idea de que el daño oxidativo se inicia en el periodo de isquemia pero aumenta sustancialmente durante la reperfusión, por la generación de las especies reactivas del oxígeno. Este mismo grupo ha evaluado el estado de oxigenación intraoperatorio, en pacientes a los que se practica resección pulmonar por neoplasia. Observan también una mejoría en el grupo RIPC en comparación con el grupo control.

En nuestro conocimiento, no existe ningún otro estudio que evalúe el comportamiento del 8-isoprostano en CAE en pacientes sometidos a lobectomía pulmonar, con preacondicionamiento isquémico remoto. En este sentido, el estudio de Moloney et al, evalúa las concentraciones de 8-isoprostano en CAE en pacientes antes y después, de cirugía de lobectomía. Estos autores no encuentran diferencias entre ambos tiempos, lo cual iría en contra de la evidencia actual acerca del daño oxidativo producido por la VUP (93, 96). Como apuntan los propios autores, una posible causa sería el momento de la toma de la muestra en el postoperatorio, a los 30 minutos del fin de la cirugía. La falta de diferencias podría deberse también a un tamaño de muestra insuficiente para este objetivo (n=19).

A destacar también de este estudio de Moloney et al, los valores de 8-isoprostano en CAE, en comparación con los observados en esta tesis. En nuestro trabajo, los valores son del orden de 3 veces los del otro trabajo (10 vs 35 pg/ml). Posiblemente, esto tenga su explicación en una diferente metodología, tanto en lo que

respecta a la recogida de aire exhalado (RTube vs dispositivo propio) como en lo que se refiere al método de medida (espectrometría de masas vs ELISA)

Un hallazgo relevante en nuestro trabajo es que los valores de 8-isoprostano en CAE son aproximadamente el triple que en plasma sanguíneo (10,7pg/ml en plasma vs 35,18 en CAE, en el grupo control), lo que hace suponer que el proceso de peroxidación lipídica tiene lugar en las membranas de las células alveolares, en proximidad con el fluido que reviste la vía respiratoria.

Como **objetivo secundario**, planteamos, el análisis del estrés nitrosativo en la cirugía de lobectomía pulmonar, se han valorado las concentraciones de nitratos y nitritos en plasma y CAE. El se sintetiza a partir de L-arginina por la NOS en diversas células de la vía aérea, tanto inflamatorias como estructurales: células del epitelio alveolar, del endotelio vascular y del músculo liso. Los nitratos y nitritos son productos finales del metabolismo del  $\text{NO}\cdot$  y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), un potente oxidante procedente de la reacción del  $\text{NO}$  y el anión superóxido (166). Durante la isquemia se lesiona el endotelio y se estimula la NOS, produciendo grandes cantidades de  $\text{NO}\cdot$  que se liberan durante la reperfusión. Esta superproducción de  $\text{NO}\cdot$  favorece su reacción con el radical superóxido, con la consiguiente formación de peroxinitritos que son tóxicos a nivel celular y contribuyen a la lipoperoxidación y el daño a otras biomoléculas en el periodo de reperfusión.

En nuestro trabajo, los niveles globales de nitratos y nitritos en CAE son mayores en el grupo control, respecto al grupo RIPC. Asimismo, en CAE aumentan en  $T_1 - T_3$ , con un patrón similar al que exhibe el 8-isoprostano, sugiriendo presencia de daño oxidativo que se inicia en el periodo de isquemia ( $T_1$ ) y que se incrementa con la reexpansión pulmonar ( $T_2$  y  $T_3$ ), en congruencia con los datos de la literatura (189, 190). Los niveles aumentados de  $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$  reflejan una elevada producción de  $\text{NO}\cdot$ . Esta molécula puede comportarse tanto como prooxidante como antioxidante según su biodisponibilidad y según la concentración de radical superóxido. Cuando la producción de  $\text{NO}\cdot$  es escasa, es decir, cuando se produce en condiciones fisiológicas por la NOS constitutiva de los vasos sanos puede inducir una vasodilatación pulmonar selectiva con mejora en la perfusión de los alveolos ventilados. Sin embargo, cuando la

producción aumenta, se ha visto que los peroxinitritos y otros RLN contribuyen al aumento de daño pulmonar (166).

Tanto las células epiteliales como las células inflamatorias producen **peróxido de hidrógeno**, a través de la conversión del anión superóxido por la SOD. Los niveles de  $H_2O_2$  en CAE son un reflejo directo de la producción de radicales libres en la vías respiratorias. En el presente trabajo, los valores de  $H_2O_2$  en CAE aumentan en T<sub>1</sub>-T<sub>3</sub> de forma similar a la observada para el 8-isoprostano y los nitritos y nitratos, en el grupo control ( $p < 0.05$ ). Además, al comparar el grupo control con el grupo RIPC, se observa una diferencia estadísticamente significativa en los tres tiempos de la cirugía. En un estudio piloto, Lases et al (92), ya publicaron que los pacientes sometidos a lobectomía pulmonar, presentaban un aumento de  $H_2O_2$  en CAE, reforzando la hipótesis de que este tipo de cirugía lleva apareado un incremento del estrés oxidativo. En este estudio además, los valores de  $H_2O_2$  se correlacionan de forma robusta con los niveles de MDA (marcador de daño oxidativo) en orina. Y aunque recogen CAE de los pacientes, no miden en estas muestras ningún parámetro de lipoperoxidación. El hecho que se detecten valores de  $H_2O_2$  en CAE en pacientes a los que se realiza lobectomía, pero no a los que se les realiza cirugía de revascularización coronaria (94), refuerza la hipótesis que la obtención de muestras de condensado directamente procedente de la vía aérea, es un método sensible para detectar patología pulmonar.

Nuestros datos contrastan con los del estudio de Wilson et al, en el estudian seis modelos isquemia reperfusión diferentes tanto en pacientes como en modelo canino (cirugía de bypass aortocoronario, trombendarterectomía pulmonar, trasplante unipulmonar en perro, clampaje aórtico para cirugía de revascularización de MMII, y perros a los que se había inducido daño pulmonar agudo). De entre todos ellos, únicamente mostraron niveles elevados de  $H_2O_2$  durante la reperfusión tisular, pacientes sometidos a trombo-endarterectomía, a las 48 h, durante el periodo postoperatorio. Una vez más, la heterogeneidad de los grupos y la diferente metodología empleada podría estar en la base de las diferencias encontradas.

**El pH** es una de las variables más estudiadas en CAE. La homeostasis del equilibrio ácido base depende del equilibrio entre los diferentes sistemas buffer de la vía aérea. En nuestro trabajo los valores de pH disminuyen en T1, durante la VPS de forma significativa ( $p = 0.006$  grupo control, y  $p = 0,012$  grupo RIPC). Tras la restauración de la ventilación bipulmonar, durante el inicio de la reperfusión del pulmón, los valores inician el ascenso, para volver a los niveles basales. La acidificación del CAE se ha relacionado con multitud de enfermedades inflamatorias de la vía aérea así como con la cirugía de resección pulmonar en pacientes con cáncer, como es nuestro caso, debido al estrés oxidativo y la activación de los neutrófilos, fundamentalmente (191).

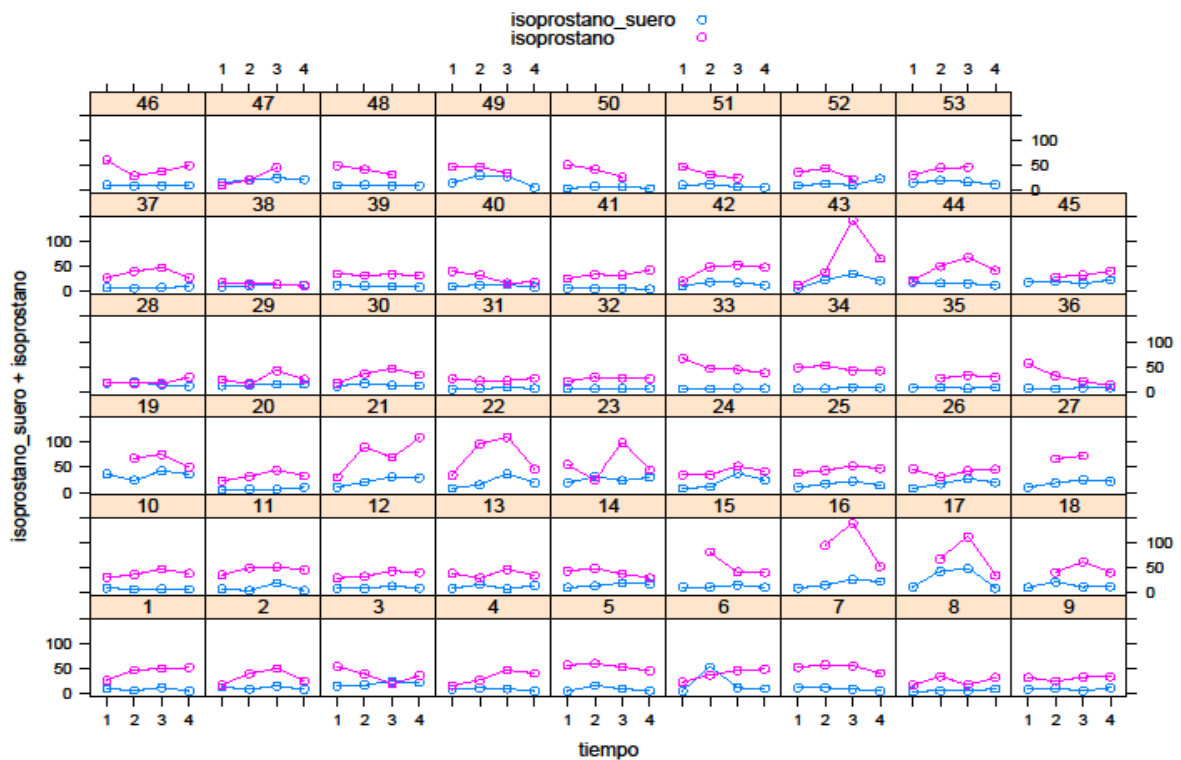
La explicación a este comportamiento del pH en la vía aérea radica en que la inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial que se produce durante el periodo de isquemia estimula la glicolisis anaerobia que produce ácido láctico e hidrogeniones ( $H^+$ ), generando acidosis intracelular (192, 193). El bicarbonato ( $HCO_3$ ) es utilizado como tampón y se genera dióxido de carbono ( $CO_2$ ) en grandes cantidades. De hecho, la determinación del incremento de la  $pCO_2$  celular y el posterior cálculo del pH intramucoso por medio de la ecuación de Henderson-Hasselbach se utiliza en la como indicador de isquemia (194).

Nuestros resultados son pues congruentes con la literatura, mostrando en la cirugía de lobectomía pulmonar, un aumento del daño oxidativo durante la VPS. Este daño se incrementa durante la fase de ventilación bipulmonar, con la reexpansión y la reperfusión pulmonares.

### 2.1.2 PREACONDICIONAMIENTO REMOTO Y MARCADORES EN PLASMA

Otro dato que arroja este trabajo, al comparar los marcadores en sangre y en CAE, es que el perfil temporal no es el mismo en ambas muestras biológicas. Del **8-isoprostano**, variable principal de este estudio, se observa en el análisis comparativo desglosado por pacientes (Figura 26), que tiende a aumentar en los tiempos T2 y T3,

los que corresponden con la isquemia-reperfusión, mientras que en plasma los niveles son no sólo menores, sino mas constantes a lo largo del estudio, sin aparente relación con la producción pulmonar. Este hallazgo, pone de manifiesto la relevancia de medir ciertos marcadores en el lugar de su síntesis puesto que el hecho de medirlos en plasma, no refleja la dinámica real de su metabolismo. Además, este hecho refuerza la hipótesis de que el origen de la producción e 8-isoprostano es el parénquima pulmonar.



**Figura 26: Valores de 8-isoprostano en plasma y en CAE, desglosados por pacientes**

La evolución temporal del 8-isoprostano en plasma, en el grupo control, es similar a la publicada por otros autores para los marcadores de peroxidación lipídica en modelos de isquemia-reperfusión. Los marcadores inician el aumento durante el periodo de isquemia, para alcanzar máximos niveles durante el periodo de reperfusión. Misthos et al (96), evalúan niveles de MDA en pacientes sometidos a lobectomía con VPS.

Los resultados obtenidos de **Nitritos/nitratos** en plasma, están en el rango de los valores considerados normales en otros estudios (20, 195). Por otra parte, los niveles de nitritos y nitratos en plasma son aproximadamente el doble que los niveles en CAE. Este hallazgo podría explicarse porque la fuente principal de NO es el endotelio de los vasos pulmonares. Además existe un comportamiento paralelo entre los valores de nitritos/nitratos en ambos tipos de muestras, como se muestra en la figura:

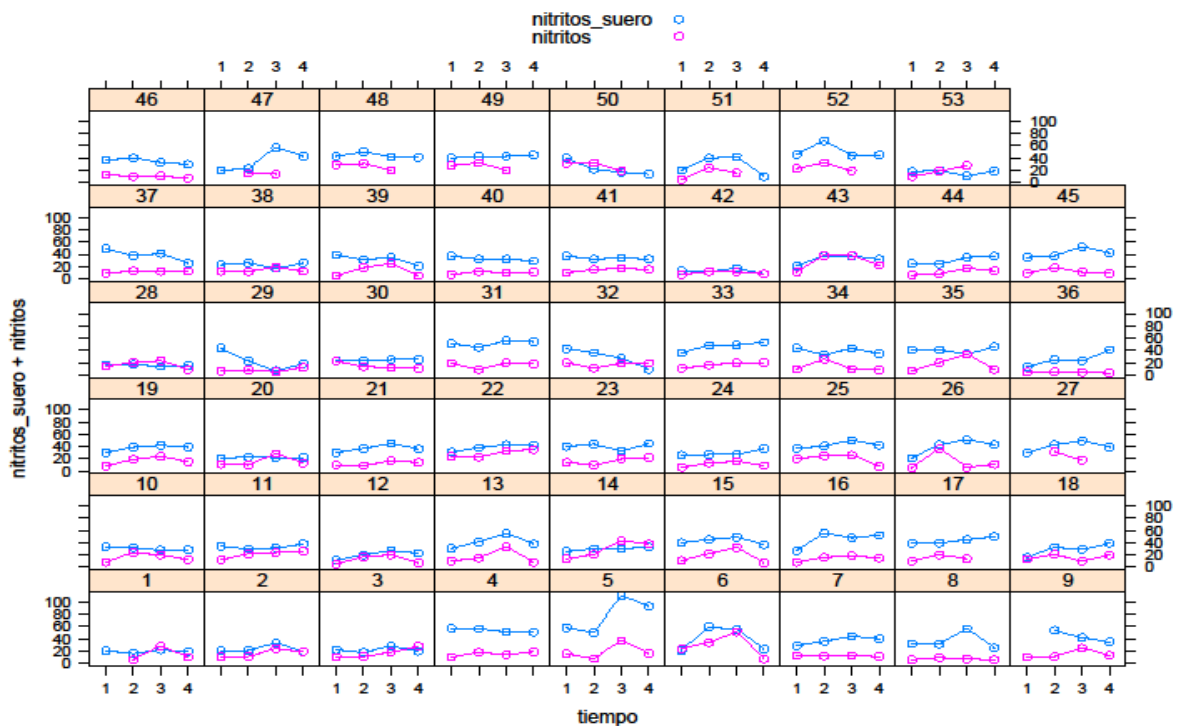


Figura 27: Valores de nitritos/nitratos en plasma y en CAE, desglosados por pacientes.

### 2.1.3 PREACONDICIONAMIENTO REMOTO Y PARÁMETROS CLÍNICOS

La resección pulmonar mediante toracotomía está clasificada como cirugía de riesgo intermedio-alto, con una tasa de mortalidad que oscila entre el 2% para lobectomías y el 6% para neumonectomías (196). Las causas de mortalidad en nuestro medio, han ido cambiando en los últimos años, para, de las complicaciones



cardiopulmonares relacionadas con la cirugía, dar paso a las complicaciones infecciosas (neumonía, empiema, sepsis) y a la lesión pulmonar aguda (ARDS) (197).

Del análisis de los datos de la sociedad europea de cirujanos torácicos, se han extraído unos factores de riesgo independiente de mortalidad perioperatoria (198), a saber: la edad, el género masculino, el grado de disnea previo, el estado funcional, el grado ASA así como la extensión de la resección. Otro factor determinante en la mortalidad periquirúrgica es el grado de especialización de la institución. En hospitales de alta complejidad, con cirujanos y unidades de cuidados postquirúrgicos especializados, la mortalidad puede ser hasta un 10 % menor que en centros no especializados (199, 200).

Entre las causas de mortalidad, destaca la lesión pulmonar aguda postoracotomía, que a diferencia de otras complicaciones cardiopulmonares apenas ha variado su incidencia en las últimas dos décadas, en los pacientes sometidos a toracotomía (entre 2-4%), aunque afortunadamente ha mejorado el pronóstico debido a la implementación de los métodos diagnósticos y terapéuticos en las unidades de críticos (201).

Como se ha visto anteriormente, la VPS necesaria para la resección pulmonar, conlleva colapso del pulmón intervenido así como disminución de la perfusión debida al propio colapso y al efecto de la VPH con el fin de disminuir el shunt producido. Este pulmón está expuesto a la aparición de atelectasias por la VPS y la manipulación quirúrgica. Además, el pulmón declive está en riesgo de sufrir sobredistensión e hiperoxia durante la ventilación mecánica. Durante el periodo de reexpansión-reperfusión se liberan mediadores proinflamatorios y radicales libres tanto en el pulmón intervenido como en el no operado (92, 202). Se han documentado complicaciones cardiovasculares tras la cirugía de resección con VPS de más de una hora de duración, atribuibles a los radicales libres de oxígeno generados por el fenómeno de isquemia-reperfusión (96). En este mismo sentido, varios estudios experimentales describen un papel central para los RLO en la patogénesis de la hipertensión pulmonar, una de las posibles causas contribuyentes para la aparición de ALI postneumonectomía (91, 203).

## **PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>**

El estado de oxigenación durante el estudio, empeora a lo largo de la cirugía de manera que observamos un descenso de PaO<sub>2</sub> en todos los tiempos (T1-T4), especialmente en T1, durante la VUP, así como un descenso de PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> en T1 y T3-T5. Estos resultados se explican por una alteración en la relación ventilación/perfusión durante y después de la VUP, tanto en el pulmón intervenido como en el declive. Es más, estos hallazgos explican en parte la relación entre el daño alveolar difuso y su contribución al deterioro del intercambio gaseoso durante la cirugía torácica.

## **Complicaciones clínicas:**

### **1. ARDS**

En este estudio, randomizado, prospectivo y controlado la incidencia global de ARDS (PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> menor de 200 en sangre arterial) 15%, similar a la publicada por otros grupos de trabajo en estudios con preacondicionamiento (5), y sometidos a lobectomía sin preacondicionamiento (96, 204, 205). Sin duda, un dato destacable es la tendencia observada hacia la protección pulmonar frente al daño por IR en los pacientes del grupo intervención (con RIPC).

Sin embargo, en la literatura, los datos acerca de la protección tisular por RIPC son contradictorios. Un estudio no mostró mejoría de la oxigenación en niños sometidos a cirugía cardíaca (103). Otro trabajo, tampoco pudo hallar diferencias entre los pacientes con RIPC y los controles, tras cirugía valvular cardíaca (206). Por el contrario, en niños a los que se intervenía de cirugía cardíaca (207), mostraban una mejor *compliance* pulmonar si se les había realizado RIPC. Y en adultos intervenidos de aneurisma de aorta abdominal, el preacondicionamiento también resultó en una mejoría de la oxigenación respecto a controles (188).

A pesar de que el mecanismo por el cual la VUP supone daño pulmonar no está exactamente establecido y parece ser que la etiología es multifactorial, la IR tiene un papel predominante en la producción del daño pulmonar. Como se ha señalado anteriormente, la reexpansión de un pulmón previamente colapsado y por tanto, una situación de isquemia-reperfusión, supone entre otros, una alteración a nivel

bioquímico con liberación de RLO tanto del pulmón colapsado como del pulmón contralateral (208).

Estos pacientes con peores parámetros de oxigenación, mostraron tiempos de VPS superior a la media del estudio ( $113\pm 39$  minutos). En congruencia con la literatura, las complicaciones cardiopulmonares están en relación con el grado de estrés oxidativo.

## **2. Fibrilación auricular**

Un total de 11 pacientes (20,7%) presentaron fibrilación auricular de nueva aparición en el postoperatorio inmediato. 6 Pacientes en el grupo control y 5 en el grupo RIPC ( $p>0,05$ ). Aunque nuestro estudio no tiene poder estadístico para encontrar diferencias entre ambos grupos para esta complicación, hay abundantes datos en la literatura que respaldan el papel de los radicales libres en la génesis de arritmias cardíacas (209, 210).

### **2.1.4 ESTRÉS OXIDATIVO Y DURACIÓN DE LA VUP**

La duración total del colapso pulmonar por la VUP tiene un efecto directo sobre la intensidad del estrés oxidativo. Como se observa en la tabla 8 así como en las figuras 25A y 25B, existe una correlación directa entre la duración de la VUP y el grado de estrés oxidativo (medido con niveles de 8-isoprostano) para el grupo control. Esta correlación es menor o no existe para el grupo RIPC.

Misthos et al (96) han sido el primer grupo en estudiar la relación entre el tiempo de VUP y complicaciones clínicas. En dicho trabajo, dividen a los pacientes en cuatro grupos, en función de la duración del colapso pulmonar. En efecto, a mayor duración de la VUP, mayores niveles de malondialdehído en plasma. Es más, el grupo con mayor duración de la VUP (120 min) presentaba de forma significativa mayor tasa de complicaciones postoperatorias, en concreto arritmias e hipertensión pulmonar.

En nuestro conocimiento no existen trabajos publicados que estudien el efecto de la duración de la VUP en pacientes sometidos a RIPC. Una vez más, se comprueba

que esta intervención mejora el daño oxidativo en la lobectomía por cáncer. De nuestro trabajo cabe destacar que el estudio de la correlación se ha realizado tanto en  $T_1$  como  $T_2$ , siendo en ambos positiva en el grupo control. Es decir, los marcadores de estrés oxidativo ya están presentes en el pulmón durante el periodo de isquemia, para aumentar durante la reperfusión.

## 2.2 Consideraciones, sesgos y limitaciones

Antes de pasar a abordar las conclusiones que arroja esta tesis en relación con los objetivos marcados, se hace necesario hacer algunas consideraciones en cuanto a la metodología. Los ensayos en pacientes complejos, en situaciones experimentales no ideales, hace plantearse algunos sesgos y limitaciones.

### MUESTRA Y TAMAÑO MUESTRAL

En cuanto a las variables preoperatorias e intraoperatorias que pudieran haber interferido en los objetivos principales y secundarios anteriormente comentados, es decir, sobre el efecto del precondicionamiento remoto sobre los marcadores de estrés oxidativo medidos en el CAE y en el plasma, y además sobre la evolución clínica postoperatoria, creemos que pueden despreciarse. La correcta asignación aleatoria de los pacientes fue confirmada con la homogeneidad de los grupos resultantes. Al comparar el grupo de estudio con el grupo control no encontramos diferencias significativas en ninguna de las variables capaces de alterar los niveles basales de estrés oxidativo: edad hipertensión arterial, antecedentes de tabaquismo, dislipemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes mellitus y tratamiento recibido.

Con los datos previos de la literatura, obtuvimos que para un riesgo  $\alpha$  de 0,05 y una potencia estadística del 80%, era necesario un tamaño muestral de 25 pacientes. Teniendo en cuenta las posibles pérdidas postaleatorización, se añadió un 10% más de casos. Con el tamaño muestral resultante pudimos obtener una potencia estadística acorde con la mínima inicialmente exigida (80%) y así poder responder a los objetivos

principales del estudio. Como se ha comentado anteriormente, la ausencia de diferencias entre grupos detectada en el estudio de algunos objetivos (complicaciones postoperatorias, significación estadística en los marcadores de estrés oxidativo para alguno de los tiempos) podría ser debido a un tamaño muestral insuficiente para estos objetivos.

AGENTES ANESTÉSICOS.

### **Agentes anestésicos y estrés oxidativo. Halogenados vs propofol**

En cuanto a los agentes anestésicos, se han de tener en consideración a la hora del diseño de un estudio con RIPC, puesto que se conocen efectos de algunos de ellos que podrían interferir en las variables del estudio. En este sentido, varios son los trabajos que atribuyen al propofol, fármaco de uso habitual en la inducción y mantenimiento anestésicos, un efecto contrario al que se busca con el precondicionamiento (211, 212).

Pero por otra parte la formulación comercial del propofol, contiene  $\alpha$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol, con potente actividad antioxidante. El propofol tiene capacidad para neutralizar radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica. La evidencia experimental atribuye al propofol un efecto protector del miocardio y pulmonar, frente a los peróxidos (213, 214). Incluso se ha objetivado una disminución de la disfunción endotelial por IR pulmonar en pulmones transplantados y tras cirugía de bypass coronario, debida al propofol.

Con toda esta evidencia, nos planteamos en esta tesis la realización de todas las inducciones anestésicas así como el mantenimiento de la anestesia general, sin propofol, con el fin de evitar una posible interferencia en los mecanismos de estrés oxidativo que se pretendían evaluar. Por el contrario, el grupo de Li et al (5), en pacientes sometidos a resección pulmonar con RIPC, utilizan la combinación remifentanilo-propofol en el mantenimiento.

Un reciente metaanálisis sobre los estudios con RIPC y sus consecuencias sobre los resultados clínicos, advierte de este posible factor de confusión a la hora de evaluar los efectos del precondicionamiento, y al tiempo pone en cuestión el uso de dichas

pautas anestésicas con propofol en los estudios que tengan por objeto de estudio el estrés oxidativo (184).

### **Opioides**

Algunos estudios sugieren que los fármacos opioides protegen las células del daño hipóxico, a través de la activación de los receptores  $\delta$  y  $\kappa$ . Se ha documentado un efecto de los opioides similar al del preconditionamiento isquémico en modelos de IR miocárdica, intestinal y músculo esquelético. No tenemos constancia que este efecto se haya valorado a nivel pulmonar.

En los pacientes de este trabajo, el uso de opioides se limita al periodo de la inducción y a bajas dosis durante el intraoperatorio, dado que todos los pacientes participantes eran portadores de un catéter epidural funcionante.

### **ELECCIÓN DE 8-ISOPROSTANO COMO MARCADOR DE ESTRÉS OXIDATIVO**

La utilidad de los isoprostanos como marcadores de estrés oxidativo está ampliamente demostrada(51-54, 215). Como ya se ha mencionado, son químicamente estables, son productos específicos de lipoperoxidación, se forman *in vivo*, poseen actividad biológica, se encuentran en cantidades detectables en los tejidos y fluidos biológicos, los niveles aumentan sustancialmente en modelos animales de daño oxidativo, no se afectan por el contenido en lípidos de la dieta, circulan en plasma y se excretan en orina (148). Algunos autores proponen que la medida de los isoprostanos, tanto en sangre como en orina, es el método no invasivo más fiable para evaluar el estrés oxidativo *in vivo* (41, 148). Además, medida de los isoprostanos ha ayudado a comprender los mecanismos de lesión por isquemia reperusión y el proceso oxidativo, *in vivo*. Pequeños cambios en el insulto isquémico, tienen su traducción en la severidad de la lipoperoxidación y por tanto, es detectable mediante la determinación de isoprostanos (216). También es posible la medición seriada de isoprostanos en sangre o plasma, como herramienta para evaluar la eficacia de estrategias diagnósticas o terapéuticas, como es nuestro caso, enfocadas a prevenir el estrés oxidativo.

Sin embargo, el marcador de lipoperoxidación utilizado tradicionalmente en la literatura, a pesar de no ser un producto específico de lipoperoxidación, ha sido el malondialdehído (MDA), cuantificado mediante métodos que utilizan el ácido tiobarbitúrico. Esta técnica, a pesar de sus limitaciones (es poco específica) tiene la ventaja de ser fácil y económica. Cuando se compara la medida de isoprostanos y MDA, para valorar los efectos del daño oxidativo, los F2-isoprostanos se muestran como marcadores más sensibles de lipoperoxidación lipídica (217).

La elección del 8-isoprostano para valorar la evolución del estrés oxidativo intraoperatorio en este trabajo, atiende a varias razones. En primer lugar, están considerados los mejores indicadores disponibles de lesión por radicales libres y su utilidad ha sido ampliamente demostrada. Aunque la mayoría de estudios que tienen por objeto el estrés oxidativo miden isoprostano en plasma y orina, ya se han publicado múltiples estudios en los que los isoprostanos se miden en CAE (55, 152, 154).

La otra razón para decantarnos por este marcador es la existencia de un método de detección, la técnica de ELISA, accesible, rápida, y técnicamente simple, que permite cuantificar isoprostanos en matrices diferentes al plasma o la orina. Mediante esta técnica, se han cuantificado isoprostanos en CAE en numerosas publicaciones anteriormente (162-164, 218-221).

Decidimos medir los marcadores de estrés oxidativo en muestras CAE para reflejar la contribución específica del pulmón, facilitando así la definición de un hipotético patrón evolutivo de los marcadores de estrés oxidativo pulmonar durante la cirugía de lobectomía. Cuando se miden las concentraciones sanguíneas y urinarias de F2-isoprostanos, éstos se producen a nivel sistémico y se excretan por orina, se refleja la lipoperoxidación "*global*" de todo el organismo y no sólo de un órgano específico (222).

Además, la persona responsable del análisis es el mismo durante todo el estudio para homogeneizar aún más el tratamiento y análisis de las muestras.

## CONDENSADO DEL AIRE EXHALADO

### **Dilución de los solutos**

Para la recogida de muestras de CAE se ha empleado un dispositivo propio, con tubo de cristal sumergido en hielo, conectado a la rama espiratoria del circuito anestésico. Todas las muestras del estudio se han recogido de esta manera, como recomienda la *ATS Task Force (146)* por lo que los valores del grupo intervención y el grupo control son comparables, sin embargo, puede haber discordancias con los resultados de otros grupos de trabajo que hayan empleado otros dispositivos.

La ventaja que supone disponer un método que de forma no invasiva permita evaluar los marcadores de enfermedad tomando muestras directamente procedentes de los pulmones, ha supuesto un aumento exponencial de trabajos en los que se analiza el CAE. A pesar la popularización de la técnica, hay aspectos en la metodología que no han sido completamente resueltos. Uno de los grupos mas críticos ha sido el de Effros et al. Por un lado, advierten de los posibles artefactos en el CAE y en la contaminación por amonio de la cavidad oral (223), y por otro, de la necesidad de evaluar el grado de dilución de la muestra (191).

En nuestro trabajo, la posibilidad de contaminación por amonio no se contempla ya que todos los pacientes están bajo anestesia general y en ventilación mecánica. La disposición del circuito de recogida de muestra evita la cavidad oral, dado que las muestras se recogen procedentes del tubo endotraqueal.

Como el CAE esta compuesto fundamentalmente de agua, las sustancias que en él se encuentran están muy diluidas. La concentración de alguna de ellas puede variar entre 1000 a 50000 veces. Así pues, para estandarizar el análisis se han propuesto diferentes marcadores de dilución, pero no hay ninguno entre ellos que se pueda considerar el marcador dilucional ideal.

Otra forma que se ha propuesto para obviar el problema de la dilución, es el uso de ratios entre diferentes marcadores, a saber: cociente nitritos/nitratos, glutation reducido/glutation oxidado y pH como cociente entre ácidos y bases.

En nuestro trabajo, no hemos empleado ningún factor de dilución puesto que no hay ninguno aceptado de forma universal.



**Deaireación de la muestra**

El proceso de deaireación afecta a la estabilidad del pH, que se medía inmediatamente después de recoger las muestras y antes de congelar la muestra a -80 °C, no influye, en base a la literatura publicada hasta el momento, en los marcadores de estrés oxidativo.

**Efecto del volumen corriente sobre el CAE obtenido**

Gessner (224) et al., en un estudio en pacientes con ALI y en ventilación mecánica, encuentran correlación entre el volumen corriente y los nitritos. De manera que un incremento de volumen corriente se traduce en un aumento de nitritos con una correlación de 0,79.

Sin embargo, McCafferty et al. (225), no encuentran relación entre el volumen minuto ni el volumen corriente con los nitritos en CAE. Además, demuestran una relación directa entre el volumen minuto y la cantidad de condensado recogido. Es mas, para un mismo volumen minuto, a mayor volumen corriente, mayor cantidad de muestra. En este trabajo, los sujetos estudiados son voluntarios sanos, y no puede descartarse que la influencia del patrón respiratorio para determinados marcadores, se produzca en condiciones de patología, con daño pulmonar importante, como el SDRA.

En el presente trabajo, el control del volumen corriente así como del volumen minuto se realiza en función de las pautas recogidas en el protocolo anestésico. En pacientes que precisan VUP, algunos con pobre función pulmonar previa por EPOC, no es posible garantizar un mismo volumen minuto a lo largo de todo el estudio. El posible efecto que esta variable pueda tener en la determinación de nitritos/nitratos creemos que es despreciable dada la correcta aleatorización de los pacientes, que se ha puesto de manifiesto con la homogeneidad de los grupos (ver tabla 4).



## **CAPÍTULO IV**

## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

En relación con los objetivos propuestos, podemos establecer las siguientes conclusiones.

1. La conclusión más relevante es la que acepta la hipótesis de la tesis como cierta, que el preconditionamiento remoto por isquemia reperfusión es un método eficaz para prevenir el estrés oxidativo, a nivel pulmonar, en la lobectomía pulmonar por cáncer de pulmón.
2. El preconditionamiento remoto por isquemia reperfusión disminuye los niveles de 8-isoprostano, nitritos y nitratos, así como de peróxido de hidrógeno en CAE de los pacientes sometidos a lobectomía pulmonar por cáncer.
3. El preconditionamiento remoto por isquemia reperfusión disminuye los niveles de 8-isoprostano, nitritos y nitratos en sangre de los pacientes sometidos a lobectomía pulmonar por cancer.
4. Los pacientes sometidos a RIPC durante la lobectomía pulmonar presentan mejor estado de oxigenación durante el postoperatorio inmediato.
5. Los pacientes sometidos a RIPC durante la lobectomía pulmonar presentan la misma tasa arritmias que los pacientes a los que no se les aplica.
6. El grado de estrés oxidativo pulmonar durante la cirugía de resección está directamente correlacionado con la duración de la ventilación pulmonar selectiva.



## **CAPÍTULO V**

### **INVESTIGACIONES FUTURAS**





Los retos a corto y medio plazo son:

1. Avanzar en el estudio de la relación entre la duración del tiempo de colapso pulmonar e isquemia y los niveles de marcadores inflamatorios en plasma (TNF 1alfa, IL-1, IL 6).
2. Estudiar *in situ*, en el borde sano del tejido pulmonar colapsado marcadores de estrés oxidativo y moléculas como HIF-1 $\alpha$  posible candidato a ser uno de los responsables del preacondicionamiento *in situ*.



## **CAPÍTULO VI**

### **ANEXOS**



## ANEXO 1. ABSTRACT

**Background:** During pulmonary lobectomy the operated lung suffers a collapse and a reactive hypoxic pulmonary vasoconstriction, followed by lung expansion-reperfusion. A severe oxidative lung injury occurs in these patients. Remote ischemic preconditioning (RIPC) may confer protection in several organs. We hypothesized that RIPC would reduce the oxidative lung injury in patients undergoing lung lobectomy.

**Methods:** This is a randomized, prospective, controlled and double blind study, conducted in fifty-three patients with non-small cell lung cancer undergoing elective lung lobectomy. Patients were randomly 1:1 assigned to 2 groups: 26 patients with limb RIPC and 27 controls. We study the time course of several oxidative stress marker levels simultaneously, in both exhaled breath condensate (EBC) and arterial blood. In EBC, 8-isoprostane (8-iso-PGF2 $\alpha$ ), nitrites + nitrates (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) levels and pH values were measured. In blood, 8-iso-PGF2 $\alpha$  and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> levels were measured. Four EBC and blood samples were collected in all patients at specific time points: T0, pre-operatively (baseline); T1, during OLV, immediately before resuming TLV; T2, immediately after resuming TLV; T3, 120 minutes after resuming TLV.

**Results:** In both, EBC and blood, a simultaneous increase of all oxidative stress marker levels was found at T1. However, a larger increase at T2 time points was found in EBC. Also, a significant and direct correlation between these marker levels and the OLV duration at T1 and T2 were found in EBC. Although, a significant decrease of pH were found at T2 and T3, inversely correlated with OLV duration.

**Conclusions:** During lung lobectomy the operated lung is collapsed and an oxidative injury occurs with an increase of oxidative stress marker levels simultaneously in EBC and blood during OLV (T1). Although these levels, increased more after resuming TLV from OLV (T2). This increase of oxidative stress marker levels at T1 and T2 time points is directly correlated with the OLV duration. Remote ischemic preconditioning protects against oxidative lung damage decreasing the of oxidative stress markers levels in EBC and blood.

**Keywords:** Remote Ischemic Preconditioning; One-lung ventilation; Oxidative lung injury; Exhaled breath condensate; Lung lobectomy.

## **ANEXO 2: INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO**

### **HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE**

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado "PREACONDICIONAMIENTO REMOTO DEL PULMÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN LA LOBECTOMIA PULMONAR. UN ESTUDIO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO" que está siendo realizado por el Dr. JOSÉ GARCÍA DE LA ASUNCIÓN del Servicio de ANESTESIOLOGÍA Y REANIMACIÓN y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

#### **Antecedentes**

Se conocen datos obtenidos a través de estudios experimentales donde el preacondicionamiento remoto del pulmón por isquemia-reperfusión es beneficioso para prevenir las complicaciones pulmonares tras la cirugía pulmonar, como son el síndrome de distrés respiratorio agudo.

#### **¿Cuál es el objetivo de este estudio?**

La realización de una técnica sencilla e inocua de isquemia y reperfusión en el miembro inferior con un manguito de presión (4 ciclos de isquemia-reperfusión de 5 min cada uno) cuando ya esté anestesiado en el quirófano. Esto no supondrá riesgo ni dolor para usted.

#### **¿Por qué se le ha pedido que participe?**

Se le pide su participación en este estudio ya que ha sido diagnosticado de UNA ENFERMEDAD PULMONAR QUE REQUIERE CIRUGÍA PULMONAR (LOBECTOMÍA) CON ANESTESIA GENERAL Y POSTOPERATORIO INMEDIATO EN LA UNIDAD DE REANIMACIÓN.

#### **¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?**

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos 5 MUESTRAS DE SANGRE 10 ML Y 4 MUESTRAS DE AGUA EXHALADA PULMONAR.

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que esté llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se le pueda poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se le realicen será siempre bajo criterio médico.

#### **¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?**

No se prevee ningún riesgo adicional para usted ya que utilizaremos para el estudio una pequeña parte de las SANGRE que le fueron extraídas durante el procedimiento quirúrgico. El riesgo previsible de su participación únicamente será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción.

**¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?**

Es muy posible que los resultados obtenidos en esta investigación tengan poco valor diagnóstico o predictivo para usted, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

**¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?**

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

**¿A quién puedo preguntar en caso de duda?**

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación. Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el LAURA BRUNO CARLOS en el teléfono 696370081

**Confidencialidad:**

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación.

Tal y como contempla la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

**¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?**

Durante su participación en este estudio, se le extraerá una muestra de SANGRE Y AGUA EXHALADA PULMONAR.

Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar si usted así lo autoriza en el marco de otros proyectos de investigación que tengan como objetivo el estudio de su enfermedad y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital.

Dicha muestra será conservada en CONGELADOR DEL LABORATORIO DE BIOQUIMICA DEL HOSPITAL CLÍNICO durante un periodo de tiempo de VARIAS SEMANAS HASTA SU ANALISIS.

Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto titulado: "PREACONDICIONAMIENTO REMOTO DEL PULMÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN LA LOBECTOMIA PULMONAR. UN ESTUDIO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO"

Investigador principal: LAURA BRUNO CARLOS

Servicio: ANESTESIOLOGÍA Y REANIMACIÓN

Yo, \_\_\_\_\_ he sido informado por el Dr. \_\_\_\_\_, colaborador del proyecto de investigación arriba mencionado, y declaro que:

- He leído la Hoja de Información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- He recibido suficiente información sobre el estudio

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

Firma del paciente:

Fecha:

Firma del Investigador:

Fecha



**CAPÍTULO VII**  
**BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFÍA**

1. Pearse RM, Moreno RP, Bauer P, Pelosi P, Metnitz P, Spies C, et al. Mortality after surgery in Europe: a 7 day cohort study. *Lancet*. 2012;380(9847):1059-65.
2. Semel ME, Lipsitz SR, Funk LM, Bader AM, Weiser TG, Gawande AA. Rates and patterns of death after surgery in the United States, 1996 and 2006. *Surgery*. 2012;151(2):171-82.
3. Lobo SM, Rezende E, Knibel MF, Silva NB, Paramo JA, Nacul FE, et al. Early determinants of death due to multiple organ failure after noncardiac surgery in high-risk patients. *Anesthesia and analgesia*. 2011;112(4):877-83.
4. Dulhunty JM, Lipman J, Finfer S, Sepsis Study Investigators for the ACTG. Does severe non-infectious SIRS differ from severe sepsis? Results from a multi-centre Australian and New Zealand intensive care unit study. *Intensive care medicine*. 2008;34(9):1654-61.
5. Li C, Xu M, Wu Y, Li YS, Huang WQ, Liu KX. Limb remote ischemic preconditioning attenuates lung injury after pulmonary resection under propofol-remifentanyl anesthesia: a randomized controlled study. *Anesthesiology*. 2014;121(2):249-59.
6. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *The Biochemical journal*. 1984;222(1):1-15.
7. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1993;215(2):213-9.
8. Cross CE, Motchnik PA, Bruener BA, Jones DA, Kaur H, Ames BN, et al. Oxidative damage to plasma constituents by ozone. *FEBS letters*. 1992;298(2-3):269-72.
9. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*. 1991;91(3C):14S-22S.
10. Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*. 1996;96(7):693-702; quiz 3-4.
11. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. A new mechanism for the toxicity of ozone. *Toxicology letters*. 1995;82-83:287-93.
12. Benzi G, Moretti A. Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free radical biology & medicine*. 1995;19(1):77-101.

13. Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biology*. 2014;2:702-14.
14. Walling C, Partch RE, Weil T. Kinetics of the decomposition of hydrogen peroxide catalyzed by ferric ethylenediaminetetraacetate complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975;72(1):140-2.
15. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-6.
16. Gorren AC, Mayer B. Nitric-oxide synthase: a cytochrome P450 family foster child. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1770(3):432-45.
17. King AJ, Brenner BM. Endothelium-derived vasoactive factors and the renal vasculature. *The American journal of physiology*. 1991;260(4 Pt 2):R653-62.
18. Ramwell P, Thomas G. Nitric oxide and its role in transplantation. *Transplantation proceedings*. 1995;27(3):2074-6.
19. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1994;24(1):112-29.
20. Lyman SV, Hurst JK. Role of compartmentation in promoting toxicity of leukocyte-generated strong oxidants. *Chemical research in toxicology*. 1995;8(6):833-40.
21. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(32):22028-34.
22. Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum*. 1986;548:9-37.
23. Vignais PM, Vignais PV. Fusicin, an inhibitor of mitochondrial SH-dependent transport-linked functions. *Biochimica et biophysica acta*. 1973;325(3):357-74.
24. Griffith OW, Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(14):4668-72.
25. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1990;280(1):1-8.

26. de la Asuncion JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1996;10(2):333-8.
27. Aggarwal S, Gross CM, Sharma S, Fineman JR, Black SM. REACTIVE OXYGEN SPECIES IN PULMONARY VASCULAR REMODELING. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(3):1011-34.
28. Davies KJA. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*. 1995;61:1-31.
29. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(9-10):1865-79.
30. Scandalios JG. Oxidative stress responses - what have genome-scale studies taught us? *Genome Biology*. 2002;3(7):reviews1019.1-reviews.6.
31. Henle ES, Han Z, Tang N, Rai P, Luo Y, Linn S. Sequence-specific DNA cleavage by Fe<sup>2+</sup>-mediated fenton reactions has possible biological implications. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(2):962-71.
32. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994;344(8924):721-4.
33. Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Thorpe SR. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1996;11 Suppl 5:48-53.
34. Collado E, Roche ADR. Oxidative stress and protein degradation. *MedClin*. 1994;103(5).
35. Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine*. 2009;361(15):1475-85.
36. Vina J, Sastre J, Anton V, Bruseghini L, Esteras A, Asensi M. Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants. *Exs*. 1992;62:136-44.
37. Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, Estrela JM, Vina J. A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Analytical biochemistry*. 1994;217(2):323-8.
38. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262(12):5488-91.

39. Lewisch SA, Levine RL. Determination of 2-oxohistidine by amino acid analysis. *Analytical biochemistry*. 1995;231(2):440-6.
40. Bird RP, Draper HH. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods in enzymology*. 1984;105:299-305.
41. Sakamoto H, Corcoran TB, Laffey JG, Shorten GD. Isoprostanes--markers of ischaemia reperfusion injury. *European journal of anaesthesiology*. 2002;19(8):550-9.
42. Wispe JR, Bell EF, Roberts RJ. Assessment of lipid peroxidation in newborn infants and rabbits by measurements of expired ethane and pentane: influence of parenteral lipid infusion. *Pediatric research*. 1985;19(4):374-9.
43. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ, 2nd. A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(23):9383-7.
44. Roberts LJ, 2nd, Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. *Biochimica et biophysica acta*. 1997;1345(2):121-35.
45. Morrow JD, Harris TM, Roberts LJ, 2nd. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Analytical biochemistry*. 1990;184(1):1-10.
46. Morrow JD, Minton TA, Mukundan CR, Campbell MD, Zackert WE, Daniel VC, et al. Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(6):4317-26.
47. Janicka M, Kot-Wasik A, Kot J, Namieśnik J. Isoprostanes-Biomarkers of Lipid Peroxidation: Their Utility in Evaluating Oxidative Stress and Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11(11):4631.
48. Taber DF, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd. A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins*. 1997;53(2):63-7.
49. Rokach J, Khanapure SP, Hwang SW, Adiyaman M, Lawson JA, FitzGerald GA. Nomenclature of isoprostanes: a proposal. *Prostaglandins*. 1997;54(6):853-73.
50. Chen Y, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd. Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(16):10863-8.
51. Reilly M, Delanty N, Lawson JA, FitzGerald GA. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation*. 1996;94(1):19-25.

52. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *The New England journal of medicine*. 1995;332(18):1198-203.
53. Montine TJ, Beal MF, Cudkowicz ME, O'Donnell H, Margolin RA, McFarland L, et al. Increased CSF F2-isoprostane concentration in probable AD. *Neurology*. 1999;52(3):562-5.
54. Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;160(1):216-20.
55. Montuschi P, Ciabattoni G, Paredi P, Pantelidis P, du Bois RM, Kharitonov SA, et al. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;158(5 Pt 1):1524-7.
56. Mallat Z, Philip I, Lebret M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation*. 1998;97(16):1536-9.
57. Cracowski JL, Cracowski C, Bessard G, Pepin JL, Bessard J, Schwebel C, et al. Increased lipid peroxidation in patients with pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(6):1038-42.
58. Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A, Minotti G, Bucciarelli T, Costantini F, et al. In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1997;17(11):3230-5.
59. Roberts LJ, 2nd, Reckelhoff JF. Measurement of F(2)-isoprostanes unveils profound oxidative stress in aged rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;287(1):254-6.
60. Richelle M, Turini ME, Guidoux R, Tavazzi I, Metairon S, Fay LB. Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet. *FEBS letters*. 1999;459(2):259-62.
61. Reilly MP, Pratico D, Delanty N, DiMinno G, Tremoli E, Rader D, et al. Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;98(25):2822-8.
62. Davi G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*. 1999;99(2):224-9.

63. Morrow JD, Roberts LJ, 2nd. Mass spectrometric quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. *Methods in enzymology*. 1999;300:3-12.
64. Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A, Tanooka H. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*. 1986;7(11):1849-51.
65. Mura M, Andrade CF, Han B, Seth R, Zhang Y, Bai XH, et al. Intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury and oncotic cell death in multiple organs. *Shock*. 2007;28(2):227-38.
66. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *The American journal of the medical sciences*. 1994;307(4):284-92.
67. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular research*. 2004;61(3):461-70.
68. Karg E, Nemeth I, Virag G, Meszaros T, Boda D, Pinter S. Oxidative stress induced by bloodless limb surgery on humans. *European journal of clinical investigation*. 1997;27(12):984-91.
69. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(38):36027-31.
70. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(47):44784-90.
71. Carmody RJ, Cotter TG. Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox report : communications in free radical research*. 2001;6(2):77-90.
72. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(29):18092-8.
73. Ferrari RS, Andrade CF. Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:590987.
74. King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, et al. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *The Annals of thoracic surgery*. 2000;69(6):1681-5.
75. Cooper JD, Patterson GA, Trulock EP. Results of single and bilateral lung transplantation in 131 consecutive recipients. *Washington University Lung Transplant*



Group. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 1994;107(2):460-70; discussion 70-1.

76. Ucar G, Topaloglu E, Kandilci HB, Gumusel B. Effect of ischemic preconditioning on reactive oxygen species-mediated ischemia-reperfusion injury in the isolated perfused rat lung. *Clinical biochemistry*. 2005;38(7):681-4.

77. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;167(4):490-511.

78. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *American heart journal*. 1999;138(2 Pt 2):S69-75.

79. Carroll MC, Holers VM. Innate autoimmunity. *Advances in immunology*. 2005;86:137-57.

80. Liu R, Ishibe Y, Ueda M. Isoflurane-sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs. *Anesthesiology*. 2000;92(3):833-40.

81. Ovechkin AV, Lominadze D, Sedoris KC, Robinson TW, Tyagi SC, Roberts AM. Lung ischemia-reperfusion injury: implications of oxidative stress and platelet-arteriolar wall interactions. *Archives of physiology and biochemistry*. 2007;113(1):1-12.

82. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(12):826-37.

83. JL B. *Anesthesia for Thoracic Surgery*. Philadelphia: WB Saunders; 1987.

84. Triantafillou AN, Benumof JL, H L. Physiology of the lateral decubitus position, the open chest and one lung ventilation. In: J k, P S, editors. *Thoracic Anesthesia*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003. p. 71-94.

85. West J. Ventilación. In: JB W, editor. *Fisiología respiratoria*. 7ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005. p. 25-35.

86. Beck DH, Doepfmer UR, Sinemus C, Bloch A, Schenk MR, Kox WJ. Effects of sevoflurane and propofol on pulmonary shunt fraction during one-lung ventilation for thoracic surgery. *British journal of anaesthesia*. 2001;86(1):38-43.

87. Bardoczky GI, Szegedi LL, d'Hollander AA, Moures JM, de Francquen P, Yernault JC. Two-lung and one-lung ventilation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the effects of position and F(IO)2. *Anesthesia and analgesia*. 2000;90(1):35-41.

88. Le Cras TD, McMurtry IF. Nitric oxide production in the hypoxic lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;280(4):L575-82.

89. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Bruegger D, Rehm M, Conzen P, et al. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology*. 2007;107(5):776-84.
90. Chappell D, Heindl B, Jacob M, Annecke T, Chen C, Rehm M, et al. Sevoflurane reduces leukocyte and platelet adhesion after ischemia-reperfusion by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology*. 2011;115(3):483-91.
91. Williams EA, Quinlan GJ, Goldstraw P, Gothard JW, Evans TW. Postoperative lung injury and oxidative damage in patients undergoing pulmonary resection. *The European respiratory journal*. 1998;11(5):1028-34.
92. Lases EC, Durkens VA, Gerritsen WB, Haas FJ. Oxidative stress after lung resection therapy: A pilot study. *Chest*. 2000;117(4):999-1003.
93. Misthos P, Katsaragakis S, Milingos N, Kakaris S, Sepsas E, Athanassiadi K, et al. Postresectional pulmonary oxidative stress in lung cancer patients. The role of one-lung ventilation. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2005;27(3):379-82; discussion 82-3.
94. Moloney ED, Mumby SE, Gajdocsi R, Cranshaw JH, Kharitonov SA, Quinlan GJ, et al. Exhaled breath condensate detects markers of pulmonary inflammation after cardiothoracic surgery. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(1):64-9.
95. Sivrikoz MC, Tuncozgun B, Cekmen M, Bakir K, Meram I, Kocer E, et al. The role of tissue reperfusion in the reexpansion injury of the lungs. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2002;22(5):721-7.
96. Misthos P, Katsaragakis S, Theodorou D, Milingos N, Skottis I. The degree of oxidative stress is associated with major adverse effects after lung resection: a prospective study. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2006;29(4):591-5.
97. Kaynar H, Meral M, Turhan H, Keles M, Celik G, Akcay F. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer letters*. 2005;227(2):133-9.
98. D'Angelo E, Koutsoukou A, Della Valle P, Gentile G, Pecchiari M. Cytokine release, small airway injury, and parenchymal damage during mechanical ventilation in normal open-chest rats. *Journal of applied physiology*. 2008;104(1):41-9.

99. Schilling T, Kozian A, Huth C, Buhling F, Kretschmar M, Welte T, et al. The pulmonary immune effects of mechanical ventilation in patients undergoing thoracic surgery. *Anesthesia and analgesia*. 2005;101(4):957-65, table of contents.
100. Michelet P, D'Journo XB, Roch A, Doddoli C, Marin V, Papazian L, et al. Protective ventilation influences systemic inflammation after esophagectomy: a randomized controlled study. *Anesthesiology*. 2006;105(5):911-9.
101. Wrigge H, Uhlig U, Zinserling J, Behrends-Callsen E, Ottersbach G, Fischer M, et al. The effects of different ventilatory settings on pulmonary and systemic inflammatory responses during major surgery. *Anesthesia and analgesia*. 2004;98(3):775-81, table of contents.
102. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.
103. Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, Frndova H, Li J, et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47(11):2277-82.
104. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993;87(3):893-9.
105. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation*. 1997;96(5):1641-6.
106. Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N, Rabinowitz B. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *The American journal of physiology*. 1997;273(4 Pt 2):H1707-12.
107. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*. 2002;106(23):2881-3.
108. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW, Donald A, Deanfield JE, MacAllister RJ. Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(3):450-6.
109. Loukogeorgakis SP, Williams R, Panagiotidou AT, Kolvekar SK, Donald A, Cole TJ, et al. Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism. *Circulation*. 2007;116(12):1386-95.

110. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovascular research*. 2008;79(3):377-86.
111. Hoole SP, Heck PM, Sharples L, Khan SN, Duehmke R, Densem CG, et al. Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control trial. *Circulation*. 2009;119(6):820-7.
112. Li L, Luo W, Huang L, Zhang W, Gao Y, Jiang H, et al. Remote preconditioning reduces myocardial injury in adult valve replacement: a randomized controlled trial. *The Journal of surgical research*. 2010;164(1):e21-6.
113. Candilio L, Malik A, Hausenloy DJ. Protection of organs other than the heart by remote ischemic conditioning. *Journal of cardiovascular medicine*. 2013;14(3):193-205.
114. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, Grundy E, et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370(9587):575-9.
115. Thielmann M, Kottenberg E, Kleinbongard P, Wendt D, Gedik N, Pasa S, et al. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*. 2013;382(9892):597-604.
116. Meng R, Asmaro K, Meng L, Liu Y, Ma C, Xi C, et al. Upper limb ischemic preconditioning prevents recurrent stroke in intracranial arterial stenosis. *Neurology*. 2012;79(18):1853-61.
117. Choi YS, Shim JK, Kim JC, Kang KS, Seo YH, Ahn KR, et al. Effect of remote ischemic preconditioning on renal dysfunction after complex valvular heart surgery: a randomized controlled trial. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2011;142(1):148-54.
118. Zimmerman RF, Ezeanuna PU, Kane JC, Cleland CD, Kempananjappa TJ, Lucas FL, et al. Ischemic preconditioning at a remote site prevents acute kidney injury in patients following cardiac surgery. *Kidney international*. 2011;80(8):861-7.
119. Er F, Nia AM, Dopp H, Hellmich M, Dahlem KM, Caglayan E, et al. Ischemic preconditioning for prevention of contrast medium-induced nephropathy: randomized pilot RenPro Trial (Renal Protection Trial). *Circulation*. 2012;126(3):296-303.
120. Zarbock A, Van Aken H, Schmidt C. Remote ischemic preconditioning and outcome: shall we all have an intermittent tourniquet? *Current opinion in anaesthesiology*. 2015;28(2):165-71.
121. Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular research*. 2006;70(2):240-53.

122. Armstrong S, Downey JM, Ganote CE. Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: induction by metabolic stress and blockade by the adenosine antagonist SPT and calphostin C, a protein kinase C inhibitor. *Cardiovascular research*. 1994;28(1):72-7.
123. Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, Nienstedt J, Dominiak P, Dendorfer A. Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKCepsilon-isoform. *Cardiovascular research*. 2002;55(3):583-9.
124. Wolfrum S, Nienstedt J, Heidbreder M, Schneider K, Dominiak P, Dendorfer A. Calcitonin gene related peptide mediates cardioprotection by remote preconditioning. *Regulatory peptides*. 2005;127(1-3):217-24.
125. Ma H, Huang X, Li Q, Guan Y, Yuan F, Zhang Y. ATP-dependent potassium channels and mitochondrial permeability transition pores play roles in the cardioprotection of theaflavin in young rat. *The journal of physiological sciences : JPS*. 2011;61(4):337-42.
126. Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, Garlid KD. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibit the mitochondrial permeability transition. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(30):20801-8.
127. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiological reviews*. 2003;83(4):1113-51.
128. Caban A, Oczkovicz G, Abdel-Samad O, Cierpka L. Influence of ischemic preconditioning and nitric oxide on microcirculation and the degree of rat liver injury in the model of ischemia and reperfusion. *Transplantation proceedings*. 2006;38(1):196-8.
129. Xiao L, Lu R, Hu CP, Deng HW, Li YJ. Delayed cardioprotection by intestinal preconditioning is mediated by calcitonin gene-related peptide. *European journal of pharmacology*. 2001;427(2):131-5.
130. Weinbrenner C, Schulze F, Sarvary L, Strasser RH. Remote preconditioning by infrarenal aortic occlusion is operative via delta1-opioid receptors and free radicals in vivo in the rat heart. *Cardiovascular research*. 2004;61(3):591-9.
131. Kato R, Foex P. Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie*. 2002;49(8):777-91.
132. Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, Fenton RA, Reinhardt CP, Gysembergh A, et al. Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. *The American journal of physiology*. 1999;277(6 Pt 2):H2451-7.

133. Schoemaker RG, van Heijningen CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000;278(5):H1571-6.
134. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *The American journal of physiology*. 1998;275(5 Pt 2):H1542-7.
135. Patel HH, Moore J, Hsu AK, Gross GJ. Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2002;34(10):1317-23.
136. Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, Zhong A, Moses M, et al. Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;285(4):H1435-43.
137. Zhang SZ, Wang NF, Xu J, Gao Q, Lin GH, Bruce IC, et al. Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning. *Anesthesiology*. 2006;105(3):550-6.
138. Kant R, Diwan V, Jaggi AS, Singh N, Singh D. Remote renal preconditioning-induced cardioprotection: a key role of hypoxia inducible factor-prolyl 4-hydroxylases. *Molecular and cellular biochemistry*. 2008;312(1-2):25-31.
139. Di Filippo C, Rossi F, Rossi S, D'Amico M. Cannabinoid CB2 receptor activation reduces mouse myocardial ischemia-reperfusion injury: involvement of cytokine/chemokines and PMN. *Journal of leukocyte biology*. 2004;75(3):453-9.
140. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. 1996;94(9):2193-200.
141. Tang ZL, Dai W, Li YJ, Deng HW. Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in early and delayed cardioprotection induced by a brief ischaemia of the small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1999;359(3):243-7.
142. Kharbanda RK, Peters M, Walton B, Kattenhorn M, Mullen M, Klein N, et al. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. *Circulation*. 2001;103(12):1624-30.
143. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MM, Cherepanov V, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiological genomics*. 2004;19(1):143-50.

144. Heidbreder M, Naumann A, Tempel K, Dominiak P, Dendorfer A. Remote vs. ischaemic preconditioning: the differential role of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cardiovascular research*. 2008;78(1):108-15.
145. Kharbanda RK, Nielsen TT, Redington AN. Translation of remote ischaemic preconditioning into clinical practice. *Lancet*. 2009;374(9700):1557-65.
146. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *The European respiratory journal*. 2005;26(3):523-48.
147. Horvath I, MacNee W, Kelly FJ, Dekhuijzen PN, Phillips M, Doring G, et al. "Haemoxygenase-1 induction and exhaled markers of oxidative stress in lung diseases", summary of the ERS Research Seminar in Budapest, Hungary, September, 1999. *The European respiratory journal*. 2001;18(2):420-30.
148. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ, 2nd. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(15):1791-800.
149. Pratico D, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. The isoprostanes in biology and medicine. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2001;12(6):243-7.
150. Antczak A, Montuschi P, Kharitonov S, Gorski P, Barnes PJ. Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(3):301-6.
151. Baraldi E, Ghio L, Piovan V, Carraro S, Ciabattini G, Barnes PJ, et al. Increased exhaled 8-isoprostane in childhood asthma. *Chest*. 2003;124(1):25-31.
152. Baraldi E, Carraro S, Alinovi R, Pesci A, Ghio L, Bordini A, et al. Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations. *Thorax*. 2003;58(6):505-9.
153. Zanconato S, Carraro S, Corradi M, Alinovi R, Pasquale MF, Piacentini G, et al. Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with stable and unstable asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;113(2):257-63.
154. Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax*. 2003;58(4):294-8.
155. Psathakis K, Papatheodorou G, Plataki M, Panagou P, Loukides S, Siafakas NM, et al. 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in the expired breath condensate of patients with pulmonary sarcoidosis. *Chest*. 2004;125(3):1005-11.

156. Lucidi V, Ciabattoni G, Bella S, Barnes PJ, Montuschi P. Exhaled 8-isoprostane and prostaglandin E(2) in patients with stable and unstable cystic fibrosis. *Free radical biology & medicine*. 2008;45(6):913-9.
157. Carpenter CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest*. 1998;114(6):1653-9.
158. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest*. 2002;122(4):1162-7.
159. Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, et al. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(3 Pt 1):1175-7.
160. Montuschi P, Barnes P, Ciabattoni G. Measurement of 8-Isoprostane in Exhaled Breath Condensate. In: Armstrong D, editor. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II. Methods in Molecular Biology*. 594: Humana Press; 2010. p. 73-84.
161. Roca O, Gomez-Olles S, Cruz MJ, Munoz X, Griffiths MJ, Masclans JR. Mechanical ventilation induces changes in exhaled breath condensate of patients without lung injury. *Respiratory medicine*. 2010;104(6):822-8.
162. Samitas K, Chorianopoulos D, Vittorakis S, Zervas E, Economidou E, Papatheodorou G, et al. Exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in patients with asthma and their relation to clinical severity. *Respiratory medicine*. 2009;103(5):750-6.
163. Makris D, Paraskakis E, Korakas P, Karagiannakis E, Sourvinos G, Siafakas NM, et al. Exhaled breath condensate 8-isoprostane, clinical parameters, radiological indices and airway inflammation in COPD. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2008;75(2):138-44.
164. Carpagnano GE, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Spanevello A, Stefano A, Di Gioia G, et al. Exhaled Interleukine-6 and 8-isoprostane in chronic obstructive pulmonary disease: effect of carbocysteine lysine salt monohydrate (SCMC-Lys). *European journal of pharmacology*. 2004;505(1-3):169-75.
165. Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, Rudinski K, Fedoulov A, Karabanov A, et al. Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients. *Chest*. 2001;120(4):1136-9.
166. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*. 2007;6(8):662-80.



167. Prieto L, Orosa B, Barato D, Marin J. The effect of different periods of argon deaeration on exhaled breath condensate pH. *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma*. 2011;48(4):319-23.
168. Rosias PP, Robroeks CM, Niemarkt HJ, Kester AD, Vernooij JH, Suykerbuyk J, et al. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate. *The European respiratory journal*. 2006;28(5):1036-41.
169. Konstantinidi EM, Lappas AS, Tzortzi AS, Behrakis PK. Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects. *The Scientific World Journal*. 2015;2015:25.
170. Horvath I DLKA. Combined Use of Exhaled Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide in Monitoring Asthma *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;158(4):1042-6.
171. Garcia-de-la-Asuncion J, Pastor E, Perez-Griera J, Belda FJ, Moreno T, Garcia-del-Olmo E, et al. Oxidative stress injury after on-pump cardiac surgery: effects of aortic cross clamp time and type of surgery. *Redox report : communications in free radical research*. 2013;18(5):193-9.
172. Ballester M, Llorens J, Garcia-de-la-Asuncion J, Perez-Griera J, Tebar E, Martinez-Leon J, et al. Myocardial oxidative stress protection by sevoflurane vs. propofol: a randomised controlled study in patients undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery. *European journal of anaesthesiology*. 2011;28(12):874-81.
173. Garcia-de-la-Asuncion J, Perez-Solaz A, Carrau M, Belda FJ, Perez-Griera J, Garriges B. Different oxidative stress marker levels in blood from the operated knee or the antecubital vein in patients undergoing knee surgery: a tourniquet-induced ischemia-reperfusion model. *Redox report : communications in free radical research*. 2012;17(5):194-9.
174. Garcia de la Asuncion J, Belda FJ, Greif R, Barber G, Vina J, Sastre J. Inspired supplemental oxygen reduces markers of oxidative stress during elective colon surgery. *The British journal of surgery*. 2007;94(4):475-7.
175. Garcia-de-la-Asuncion J, Barber G, Rus D, Perez-Griera J, Belda FJ, Marti F, et al. Hyperoxia during colon surgery is associated with a reduction of xanthine oxidase activity and oxidative stress in colonic mucosa. *Redox report : communications in free radical research*. 2011;16(3):121-8.
176. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994;149(3 Pt 1):818-24.

177. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, et al. Increase in Circulating Products of Lipid Peroxidation (F2-Isoprostanes) in Smokers — Smoking as a Cause of Oxidative Damage. *New England Journal of Medicine*. 1995;332(18):1198-203.
178. Fridovich I. Hypoxia and oxygen toxicity. *Advances in neurology*. 1979;26:255-9.
179. Karuppasamy P, Chaubey S, Dew T, Musto R, Sherwood R, Desai J, et al. Remote intermittent ischemia before coronary artery bypass graft surgery: a strategy to reduce injury and inflammation? *Basic research in cardiology*. 2011;106(4):511-9.
180. Lucchinetti E, Bestmann L, Feng J, Freidank H, Clanachan AS, Finegan BA, et al. Remote ischemic preconditioning applied during isoflurane inhalation provides no benefit to the myocardium of patients undergoing on-pump coronary artery bypass graft surgery: lack of synergy or evidence of antagonism in cardioprotection? *Anesthesiology*. 2012;116(2):296-310.
181. Rahman IA, Mascaro JG, Steeds RP, Frenneaux MP, Nightingale P, Gosling P, et al. Remote ischemic preconditioning in human coronary artery bypass surgery: from promise to disappointment? *Circulation*. 2010;122(11 Suppl):S53-9.
182. Heusch G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet*. 2013;381(9861):166-75.
183. Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Bottcher M, Kaltoft AK, Terkelsen CJ, et al. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet*. 2010;375(9716):727-34.
184. Remote Preconditioning Trialists G, Healy DA, Khan WA, Wong CS, Moloney MC, Grace PA, et al. Remote preconditioning and major clinical complications following adult cardiovascular surgery: systematic review and meta-analysis. *International journal of cardiology*. 2014;176(1):20-31.
185. Soncul H, Oz E, Kalaycioglu S. Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung. *Chest*. 1999;115(6):1672-7.
186. Olguner CG, Koca U, Altekin E, Ergur BU, Duru S, Girgin P, et al. Ischemic preconditioning attenuates lipid peroxidation and apoptosis in the cecal ligation and puncture model of sepsis. *Experimental and therapeutic medicine*. 2013;5(6):1581-8.
187. Harkin DW, Barros D'Sa AA, McCallion K, Hoper M, Campbell FC. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia--reperfusion protects against acute lung injury. *Journal of vascular surgery*. 2002;35(6):1264-73.
188. Li C, Li YS, Xu M, Wen SH, Yao X, Wu Y, et al. Limb remote ischemic preconditioning for intestinal and pulmonary protection during elective open

infrarenal abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Anesthesiology*. 2013;118(4):842-52.

189. Milne GL, Sanchez SC, Musiek ES, Morrow JD. Quantification of F2-isoprostanes as a biomarker of oxidative stress. *Nature protocols*. 2007;2(1):221-6.

190. Stevens RM, Jahania MS, Stivers JE, Mentzer RM, Jr., Lasley RD. Effects of in vivo myocardial ischemia and reperfusion on interstitial nitric oxide metabolites. *The Annals of thoracic surgery*. 2002;73(4):1261-6.

191. .

192. Mela L. Mitochondrial function in cerebral ischemia and hypoxia: comparison of inhibitory and adaptive responses. *Neurological research*. 1979;1(1):51-63.

193. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988;45(4):673-6.

194. Gutierrez G, Palizas F, Doglio G, Wainsztein N, Gallesio A, Pacin J, et al. Gastric intramucosal pH as a therapeutic index of tissue oxygenation in critically ill patients. *Lancet*. 1992;339(8787):195-9.

195. Tsikas D. A critical review and discussion of analytical methods in the L-arginine/nitric oxide area of basic and clinical research. *Analytical biochemistry*. 2008;379(2):139-63.

196. Boffa DJ, Allen MS, Grab JD, Gaissert HA, Harpole DH, Wright CD. Data from The Society of Thoracic Surgeons General Thoracic Surgery database: the surgical management of primary lung tumors. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2008;135(2):247-54.

197. Licker MJ, Widikker I, Robert J, Frey JG, Spiliopoulos A, Ellenberger C, et al. Operative mortality and respiratory complications after lung resection for cancer: impact of chronic obstructive pulmonary disease and time trends. *The Annals of thoracic surgery*. 2006;81(5):1830-7.

198. Falcoz PE, Conti M, Brouchet L, Chocron S, Puyraveau M, Mercier M, et al. The Thoracic Surgery Scoring System (Thoracoscore): risk model for in-hospital death in 15,183 patients requiring thoracic surgery. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2007;133(2):325-32.

199. Urbach DR, Baxter NN. Does it matter what a hospital is "high volume" for? Specificity of hospital volume-outcome associations for surgical procedures: analysis of administrative data. *Bmj*. 2004;328(7442):737-40.

200. Lien YC, Huang MT, Lin HC. Association between surgeon and hospital volume and in-hospital fatalities after lung cancer resections: the experience of an Asian country. *The Annals of thoracic surgery*. 2007;83(5):1837-43.
201. Dulu A, Pastores SM, Park B, Riedel E, Rusch V, Halpern NA. Prevalence and mortality of acute lung injury and ARDS after lung resection. *Chest*. 2006;130(1):73-8.
202. Cheng YJ, Chan KC, Chien CT, Sun WZ, Lin CJ. Oxidative stress during 1-lung ventilation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2006;132(3):513-8.
203. Bigatello LM, Allain R, Gaissert HA. Acute lung injury after pulmonary resection. *Minerva anesthesiologica*. 2004;70(4):159-66.
204. Licker M, de Perrot M, Spiliopoulos A, Robert J, Diaper J, Chevalley C, et al. Risk factors for acute lung injury after thoracic surgery for lung cancer. *Anesthesia and analgesia*. 2003;97(6):1558-65.
205. Alam N, Park BJ, Wilton A, Seshan VE, Bains MS, Downey RJ, et al. Incidence and risk factors for lung injury after lung cancer resection. *The Annals of thoracic surgery*. 2007;84(4):1085-91; discussion 91.
206. Kim JC, Shim JK, Lee S, Yoo YC, Yang SY, Kwak YL. Effect of combined remote ischemic preconditioning and postconditioning on pulmonary function in valvular heart surgery. *Chest*. 2012;142(2):467-75.
207. Zhou W, Zeng D, Chen R, Liu J, Yang G, Liu P, et al. Limb ischemic preconditioning reduces heart and lung injury after an open heart operation in infants. *Pediatric cardiology*. 2010;31(1):22-9.
208. Kozian A, Schilling T, Rocken C, Breitling C, Hachenberg T, Hedenstierna G. Increased alveolar damage after mechanical ventilation in a porcine model of thoracic surgery. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*. 2010;24(4):617-23.
209. Slagsvold KH, Rognmo O, Hoydal M, Wisloff U, Wahba A. Remote ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and influences myocardial microRNA expression in atrial myocardium during coronary bypass surgery. *Circulation research*. 2014;114(5):851-9.
210. Brevoord D, Hollmann MW, De Hert SG, van Dongen EH, Heijnen BG, de Bruin A, et al. Effect of remote ischemic conditioning on atrial fibrillation and outcome after coronary artery bypass grafting (RICO-trial). *BMC anesthesiology*. 2011;11:11.
211. Kottenberg E, Thielmann M, Bergmann L, Heine T, Jakob H, Heusch G, et al. Protection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass graft surgery with isoflurane but not propofol - a clinical trial. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 2012;56(1):30-8.

212. Kottenberg E, Musiolik J, Thielmann M, Jakob H, Peters J, Heusch G. Interference of propofol with signal transducer and activator of transcription 5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass grafting. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2014;147(1):376-82.
213. Murphy PG, Bennett JR, Myers DS, Davies MJ, Jones JG. The effect of propofol anaesthesia on free radical-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *European journal of anaesthesiology*. 1993;10(4):261-6.
214. Alvarez-Ayuso L, Calero P, Granado F, Jorge E, Herrero C, Torralba A, et al. Antioxidant effect of gamma-tocopherol supplied by propofol preparations (Diprivan) during ischemia-reperfusion in experimental lung transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2004;17(2):71-7.
215. Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(35):24441-4.
216. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free radical biology & medicine*. 2000;28(4):505-13.
217. Longmire AW, Swift LL, Roberts LJ, 2nd, Awad JA, Burk RF, Morrow JD. Effect of oxygen tension on the generation of F2-isoprostanes and malondialdehyde in peroxidizing rat liver microsomes. *Biochemical pharmacology*. 1994;47(7):1173-7.
218. Piotrowski WJ, Antczak A, Marczak J, Nawrocka A, Kurmanowska Z, Gorski P. Eicosanoids in exhaled breath condensate and BAL fluid of patients with sarcoidosis. *Chest*. 2007;132(2):589-96.
219. Li Y, Chongsuvivatwong V, Geater A, Liu A. Exhaled breath condensate cytokine level as a diagnostic tool for obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep medicine*. 2009;10(1):95-103.
220. Ko FW, Lau CY, Leung TF, Wong GW, Lam CW, Hui DS. Exhaled breath condensate levels of 8-isoprostane, growth related oncogene alpha and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory medicine*. 2006;100(4):630-8.
221. Dalaveris E, Kerenidi T, Katsabeki-Katsafli A, Kiropoulos T, Tanou K, Gourgoulis KI, et al. VEGF, TNF-alpha and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer. *Lung cancer*. 2009;64(2):219-25.
222. Shoskes DA, Webster R, Shahed A. Oxidant stress in cadaveric and living kidney donors as markers of renal injury: utility of total antioxidant capacity and isoprostane levels in urine. *Transplantation proceedings*. 2000;32(4):804-5.

## BIBLIOGRAFÍA

223. Effros RM, Dunning MB, 3rd, Biller J, Shaker R. The promise and perils of exhaled breath condensates. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004;287(6):L1073-80.
224. Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H, Lange T, Engelmann L, Schauer J, et al. Exhaled breath condensate nitrite and its relation to tidal volume in acute lung injury. *Chest*. 2003;124(3):1046-52.
225. McCafferty JB, Bradshaw TA, Tate S, Greening AP, Innes JA. Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite, and protein concentrations. *Thorax*. 2004;59(8):694-8.