

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Cirurgia



**ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES
SOMETIDOS A LOBECTOMÍA PULMONAR**

TESIS DOCTORAL

Eva García del Olmo

Directores:

Dr. D. José García de la Asunción

Prof. Dr. D. Ricardo Guijarro Jorge

Dr. D. Antonio Arnau Obrer

Valencia, Febrero de 2017



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Título de la tesis: “Estudio del estrés oxidativo en pacientes sometidos a lobectomía pulmonar.”

Doctoranda: Eva García del Olmo

Directores:

Dr. José García de la Asunción.

Dr. Ricardo Guijarro Jorge.

Dr. Antonio Arnau Obrer.

Programa de doctorado: 3042 MEDICINA – R.D. 1393/2007. Departamento de Cirugía. Facultat de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Fecha: Febrero 2017



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

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

Dr. D. Ricardo Guijarro Jorge, Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Universidad de Valencia. Jefe del Servicio de Cirugía Torácica del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

Dr. D. Antonio Arnau Obrer, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Universidad de Valencia. Jefe Clínico del Servicio de Cirugía Torácica del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

CERTIFICAN que:

Doña Eva García del Olmo, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección la tesis: “**Estudio del estrés oxidativo en pacientes sometidos a lobectomía pulmonar.**” para la obtención del Grado de Doctor.

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

Valencia, 17 de Febrero de 2017.

Dr. José García de la Asunción Dr. Ricardo Guijarro Jorge Dr. Antonio Arnau Obrer

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido en la realización de este trabajo, especialmente:

A mis directores de tesis:

Al Dr. José García de la Asunción, pura imagen de la vocación científica e investigador incesante. Por ser el pilar más importante de este trabajo. Gracias por su inestimable ayuda, trabajo, dedicación y confianza.

Al Dr. Ricardo Guijarro Jorge y al Dr. Antonio Arnau Obrer por todas las enseñanzas que me han dado y me dan cada día sobre la Cirugía Torácica y que han sido clave en mi formación como especialista. Así como por su constante estímulo durante estos años para que llevase a cabo este proyecto.

Al Dr. Jaime Pérez Griera, médico adjunto del Servicio de Laboratorio de Bioquímica del Hospital Clínico Universitario por su dedicación y su imprescindible ayuda en el trabajo diario en el laboratorio.

Mi agradecimiento a todos los compañeros médicos residentes, médicos adjuntos y de enfermería del quirófano de Cirugía Torácica y de Reanimación del Hospital Clínico de Valencia que han colaborado en algún momento en la consecución de este trabajo.

Gracias a Alejandro por su paciencia y comprensión, por sacrificar su tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío. Por inspirarme a ser mejor puedo decir que todo mi trabajo lleva mucho de ti, gracias por estar siempre a mi lado.

Con todo mi cariño y admiración a mis padres y a mi hermana por quererme tanto, por su apoyo incondicional y por ayudarme a lograr mis sueños.

A mis padres.

INDICE GENERAL

I. PRECEDENTES TEÓRICOS

1. INTRODUCCIÓN	3
2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	5
2.1. Concepto de radical libre.....	5
2.2. El oxígeno	6
2.3. Principales radicales libres de oxígeno	6
2.4. Especies reactivas del nitrógeno.....	10
2.5. Fuentes de las especies reactivas de oxígeno.....	11
2.6. Sistemas antioxidantes: enzimáticos y no enzimáticos	15
2.7. Estrés oxidativo y daño a las biomoléculas	21
3. CONCEPTO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN (I-R)	25
3.1. Relación entre I-R y estrés oxidativo	26
3.2. Lesión pulmonar por I-R	27
4. FISIOPATOLOGÍA DE LA LOBECTOMÍA PULMONAR	29
4.1. Relación ventilación/perfusión (V/Q).....	29
4.2. Relación V/Q durante la lobectomía pulmonar	32
4.3. Daño pulmonar inducido por la lobectomía	33
5. CONDENSADO DE AGUA EXHALADA (CAE).....	35

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

III. OBJETIVOS

IV. METODOLOGÍA

1. PACIENTES.....	49
2. ANESTESIA Y MONITORIZACIÓN	50
3. PROTOCOLO QUIRÚRGICO	52
5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CAE.....	57

6. MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	58
6.1. Determinación de 8-isoprostano en el plasma sanguíneo y en el CAE	58
6.2. Determinación de nitritos y nitratos en el plasma sanguíneo y el CAE	59
6.3. Determinación de peróxido de hidrógeno en el CAE	60
6.4. Determinación de MDA	60
6.5. Determinación de glutatión reducido (GSH)	61
6.6. Determinación de glutatión oxidado (GSSG).....	62
6.7. Determinación del cociente glutatión oxidado/glutatión total	63
6.8. Determinación de potencial redox (E _h) de GSSG/2GSH.....	63
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64

V. RESULTADOS

1. Descripción de los resultados correspondientes al estudio: García-de-la-Asunción J, et al. Oxidative lung injury correlates with one-lung ventilation time during pulmonary lobectomy: a study of exhaled breath condensate and blood. Eur J Cardiothorac Surg 2015; doi:10.1093/ejcts/ezv207.	69
2. Descripción de los resultados correspondientes al estudio: José García-de-la-Asunción, et al. Glutathione oxidation correlates with one-lung ventilation time and PO ₂ /FiO ₂ ratio during pulmonary lobectomy. Redox Report 2016; 21: 219-226.	85

VI. DISCUSIÓN

1. Discusión correspondiente a los resultados del estudio: García-de-la-Asunción J, et al. Oxidative lung injury correlates with one-lung ventilation time during pulmonary lobectomy: a study of exhaled breath condensate and blood. Eur J Cardiothorac Surg 2015; doi:10.1093/ejcts/ezv207.	99
2. Discusión correspondiente a los resultados del estudio: José García-de-la-Asunción, et al. Glutathione oxidation correlates with one-lung ventilation time and PO ₂ /FiO ₂ ratio during pulmonary lobectomy. Redox Report 2016; 21: 219-226.	105
3. Consideraciones y limitaciones del estudio	108

VII. CONCLUSIONES

VIII. FUTURAS INVESTIGACIONES

IX. BIBLIOGRAFÍA

X. ANEXOS

ABREVIATURAS Y SIGLAS UTILIZADAS

ALI: Lesión pulmonar aguda (*Acute Lung Injury*).

ARDS: Síndrome de distrés respiratorio agudo (*Acute Respiratory Distress Syndrome*).

ASA: *American Society of Anesthesia*.

ATP: Adenosín 5'-trifosfato.

CO₂: Dióxido de carbono.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EDTA: Ácido etilendiamino tetracético.

ELWI: Índice de agua extravascular pulmonar (*Extravascular Lung Water Index*).

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

ETCO₂: *End tidal CO₂*.

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido (reducido).

FEV₁: Forced Expiratory Volume in one second

FiO₂ : Fracción inspiratoria de oxígeno.

FVC: Forced Vital Capacity

GSH: Glutación reducido.

GSSG: Glutación oxidado.

GS-T: Glutation S-transferasa.

GPx : Glutación peroxidasa.

GR: Glutación reductasa

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

IL: Interleucina.

IMC: Índice de Masa Corporal.

I-R: Isquemia-Reperfusión.

LID: Lóbulo inferior derecho

LII: Lóbulo inferior izquierdo

LMD: Lóbulo medio derecho

LSD: Lóbulo superior derecho

LSI: Lóbulo superior izquierdo

MDA: Malondialdehido

NADH: Nicotinadeninucleótido (reducido).

NADPH: Nicotinadeninucleótido fosfato.

NO₂: Radical dióxido de nitrógeno.

NO: Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintetasa.

O₂: Oxígeno.

O₂⁻: Anión superóxido

OH: Radical hidroxilo.

PaO₂: Presión arterial de oxígeno.

PaO₂/FIO₂: Ratio presión arterial de oxígeno/fracción inspiratoria de oxígeno.

PaCO₂: Presión arterial de dióxido de carbono.

RLO: Radicales libres de oxígeno.

SpO₂: Saturación e oxígeno por pulsioximetría.

SOD: Superóxido dismutasa.

TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa.

VUP: Ventilación unipulmonar.

VBP: Ventilación bipulmonar.

XOR: Xantina oxidoreductasa

XO: Xantina oxidasa.

XDH: Xantina deshidrogenasa.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Datos demográficos y clínicos de los pacientes.

Tabla II. *Time course* de los gases arteriales durante las lobectomías.

Tabla III. Datos demográficos, preoperatorios e intraoperatorios.

Tabla IV. Gasometrías arteriales durante las lobectomías pulmonares.

Tabla V. Potencial redox del par GSSG/2GSH y su correlación con el tiempo de colapso pulmonar y el cociente PaO_2/FiO_2 durante las lobectomías pulmonares.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Generación de radicales libres de oxígeno por la reducción tetravalente del oxígeno a agua.

Figura 2. Generación de radicales libres de oxígeno por la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Figura 3. Generación de radicales libres de oxígeno por el sistema hipoxantina/xantina oxidasa.

Figura 4. Representación esquemática del ciclo redox del glutatión.

Figura 5. Desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes.

Figura 6. Esquema del daño pulmonar por isquemia-reperfusión.

Figura 7. Distribución del flujo sanguíneo pulmonar.

Figura 8. Variaciones de la relación ventilación/perfusión (V/Q).

Figura 9. Cambios en la relación V/Q durante la lobectomía pulmonar.

Figura 10. Formación de componentes volátiles y no volátiles en el CAE.

Figura 11. Esquema de un dispositivo para la recogida de CAE.

Figura 12: Líneas axilares anterior, media y posterior relacionadas con los músculos extratorácicos. Incisión de toracotomía anterolateral.

Figura 13-A: Vista del hilio pulmonar en una toracotomía anterolateral.

Figura 13-B: Vista del hilio pulmonar en una toracotomía anterolateral.

Figura 13-C: Toracotomía anterolateral.

Figura 14. Esquema de los tiempos de recogida de muestras.

Figura 15. Sistema de recogida del CAE

Figura 16A. *Time course* de las concentraciones de 8-isoprostano en el CAE

Figura 16B. *Time course* de las concentraciones de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ en el CAE.

Figura 16C. *Time course* de las concentraciones de H_2O_2 en el CAE.

Figura 16D. *Time course* de los valores del pH en el CAE.

Figura 16E. *Time course* de las concentraciones de 8-isoprostano en el plasma sanguíneo.

Figura 16F. *Time course* de las concentraciones de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ en el plasma sanguíneo.

Figura 17. Coeficientes de correlación de Pearson (r) del tiempo de colapso pulmonar y los valores de los diferentes marcadores en el CAE (A, B, C y D).

Figura 18. Coeficientes de correlación de Pearson (r) del tiempo de colapso pulmonar y los valores de algunos marcadores en sangre arterial (A, B, C y D).

Figura 19. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre marcadores de daño oxidativo en el CAE y con el cociente $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (A, B, C y D).

Figura 20. *Time course* de los niveles de marcadores de la oxidación del glutatión (GSH, GSSG, $[\text{2GSSG}/(\text{GSH} + \text{2GSSG})] \times 100$) (Fig. 20A-C) y de la peroxidación lipídica (MDA) (Fig. 20D) en sangre arterial.

Figura 21. Coeficientes de Pearson (r) para las correlaciones entre tiempo de colapso pulmonar y los marcadores de oxidación del glutatión (GSH, GSSG, cociente glutatión oxidado/glutatión total) y MDA en sangre, en los tiempos T1 y T2.

Figura 22. Coeficientes de correlación de Pearson (r), entre los valores del cociente $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ y los valores de los marcadores de la oxidación del glutatión y de la peroxidación lipídica en sangre en 2 tiempos críticos: T1 y T2 (Fig. 22 A-C). Y entre los valores de los cocientes $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ en sangre arterial y el tiempo total de colapso pulmonar (Fig. 22 D).

PRECEDENTES TEÓRICOS

I. PRECEDENTES TEÓRICOS

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han producido numerosos y sustanciales avances en las técnicas quirúrgicas, en los procedimientos anestésicos y en los cuidados postoperatorios, sin embargo la morbimortalidad postoperatoria permanece más elevada de lo que cabría esperar (Pearse et al. 2012; Semel et al. 2012). Independientemente del tipo de cirugía que se haya realizado, la causa más frecuente de la mortalidad en el período postoperatorio es la disfunción multiorgánica (Lobo et al. 2011). Siendo la respuesta inflamatoria sistémica la base etiopatogénica de esta disfunción multiorgánica (Dulhunty et al. 2008).

El mayor desarrollo en la Cirugía Torácica ha ocurrido durante el siglo XX, facilitado por el advenimiento de la intubación traqueal y la ventilación con presión positiva facilitada por los relajantes musculares. Al principio del siglo XX las principales indicaciones de la Cirugía Torácica eran los empiemas, los cuales eran tratados con resección costal y drenaje, y además la tuberculosis pulmonar, donde se realizaba un neumotórax artificial. Con la aparición de los antibióticos y la quimioterapia antituberculosa se revolucionó el tratamiento de las enfermedades infecciosas pulmonares. Y a partir de entonces las enfermedades neoplásicas pulmonares pasaron a ser la indicación más común de la de toracotomía. Las técnicas de ligadura de las estructuras hiliares desarrolladas por W. E. Riehoff y E. D. Churchill en la década de los 30 hicieron posible las lobectomías pulmonares y se convirtieron en una alternativa preferible a la neumonectomía en las décadas de los 50 y los 60 (Jordan et al. 2000).

La resección pulmonar mediante toracotomía está considerada de riesgo medio-alto con una tasa de mortalidad del 2% para las lobectomías y del 6% para las neumonectomías (Boffa et al. 2008). El edema pulmonar puede complicar el período postoperatorio de estos pacientes y es una potencial

complicación después de una resección pulmonar. En su forma menos severa se denomina daño pulmonar agudo (*Acute Lung Injury, ALI*) y en su forma más grave: síndrome de distrés respiratorio agudo (*Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS*). La incidencia del edema pulmonar post resección pulmonar depende de las definiciones usadas. Entre 4-7% de los pacientes después de una neumonectomía y entre 1-7% después de una lobectomía usando la definición de ALI/ARDS de la American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS) (Jordan et al. 2000; Baudouin 2003). En las últimas dos décadas han habido pocos cambios en la incidencia del edema pulmonar post-resección pulmonar, oscilando estos valores entre 2-5% (Dulu et al. 2006).

La necesidad de colapsar el pulmón patológico durante la lobectomía, supone que el pulmón sufra una situación de hipoperfusión e hipooxigenación tisular con la consiguiente vasoconstricción hipóxica (Marshall et al. 1981; Orchandet al. 1983) que aún empeora más la situación. Posteriormente, tras la lobectomía se expande el pulmón operado y se produce un fenómeno de reperfusión y reoxigenación, con aparición de daño oxidativo, lo cual supone un daño pulmonar adicional, que puede empeorar la vasoconstricción hipóxica (Ward 2006). En este contexto, el estrés oxidativo es muy probable que este presente y sea responsable al menos en parte de la patogénesis del daño pulmonar post lobectomía (Williams et al. 1998; Jordan et al. 2000).

Hasta ahora los estudios que se han realizado en pacientes con cáncer de pulmón y operados de lobectomía pulmonar, se han diseñado buscando las consecuencias de la isquemia-reperfusión pulmonar. Pero han sido escasos y muy centrados en un solo marcador de estrés oxidativo como veremos más adelante. Nuestro propósito al diseñar los estudios que dan base a esta memoria doctoral, fue estudiar el efecto de la lobectomía pulmonar sobre los niveles de varios marcadores de estrés oxidativo en sangre y paralelamente, también en el agua exhalada pulmonar. Pero además, buscar una correlación entre los niveles de estos marcadores de daño oxidativo y el tiempo de colapso pulmonar durante la lobectomía.

La privación de oxígeno durante la isquemia o la no ventilación conduce al daño celular por hipoxia. Aunque, paradójicamente la reperfusión de los tejidos hipóxicos, pueden producir aún más daño celular. Existe abundante evidencia de que el daño por reperfusión está originado por la interacción de las especies reactivas de oxígeno, factores endoteliales y los neutrófilos (Grace 1994). Los pulmones son órganos críticos en los procesos de estrés oxidativo, tanto de origen sistémico como el originado en el mismo pulmón (Perrot et al. 2003; Chow et al. 2003).

2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

2.1. Concepto de radical libre

Químicamente, un radical libre es definido como aquella especie química, molécula o fragmento molecular, que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital más externo o de valencia. La presencia de electrones desapareados hace que los radicales libres sean muy reactivos. El tiempo de reacción radical-radical o radical-molécula es muy corto, del orden de milisegundos. Cediendo el electrón desapareado y dando lugar a una reacción en cadena que puede perpetuar la existencia de los radicales libres (Simic et al. 1988). En la naturaleza los radicales libres más abundantes son los oxigenados y se denominan radicales libres de oxígeno (RLO) o bien especies reactivas de oxígeno (ERO).

Debido a que la inmensa mayoría de los organismos vivos se desarrollan en presencia de oxígeno, estos están expuestos a la generación de ERO. Estos son los responsables del daño oxidativo de las macromoléculas biológicas como ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas (Sies et al. 1983). Así pues participan en los mecanismos fisiológicos celulares y fisiopatológicos de muchas enfermedades, procesos como el envejecimiento, el ejercicio físico agotador, la apoptosis, el efecto de la radiación ionizante y los contaminantes ambientales (Dröge 2002). Así mismo, existen también radicales libres

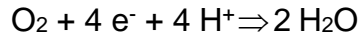
nitrogenados o especies reactivas de nitrógeno (ERN), cuya importancia ha crecido considerablemente en los últimos años (Pacher et al. 2007).

2.2. El oxígeno

Puesto que la mayoría de los radicales libres derivan del oxígeno, detallaremos a continuación algunas de sus propiedades. El oxígeno es el tercer elemento químico más abundante del universo, detrás del hidrógeno y el helio. En la naturaleza, el oxígeno aparece mayoritariamente en forma molecular diatómica (O_2), debido a que es su forma más estable. Estando presente en la atmósfera terrestre al nivel del mar a una concentración de 21%. El oxígeno molecular contiene 16 electrones, distribuidos en los orbitales moleculares. En total tiene 10 electrones enlazantes y 6 electrones antienlazantes de acuerdo con la teoría del orbital molecular (TOM). Los electrones que forman los orbitales antienlazantes poseen espines paralelos, que es la estructura electrónica termodinámicamente más estable. La molécula de oxígeno en estado basal tiene 2 electrones desapareados en dos orbitales enlazantes diferentes. Por ello algunos autores lo consideran una especie radicalaria. Esta estructura electrónica le capacita para reaccionar eficazmente con radicales libres y captar electrones libres (Cheeseman y Slater 1993). Existe un gran número de especies derivadas del oxígeno que, o bien son muy reactivas, o bien son capaces de dar lugar a especies reactivas. Algunas de estas especies son auténticos radicales libres derivados del oxígeno, como el radical hidroxilo. Otras como el peróxido de hidrógeno, no son en realidad radicales libres.

2.3. Principales radicales libres de oxígeno

Las principales moléculas oxidantes en los sistemas biológicos son los radicales libres de oxígeno. Los RLO son metabolitos tóxicos que representan estados intermedios de la reducción electroquímica del oxígeno a agua. La reacción habitual de la molécula de oxígeno (O_2) es su reducción por el aporte de 4 electrones por parte de un agente reductor.



Existen en la naturaleza un gran número de radicales libres, tanto derivados del oxígeno, como derivados del nitrógeno.

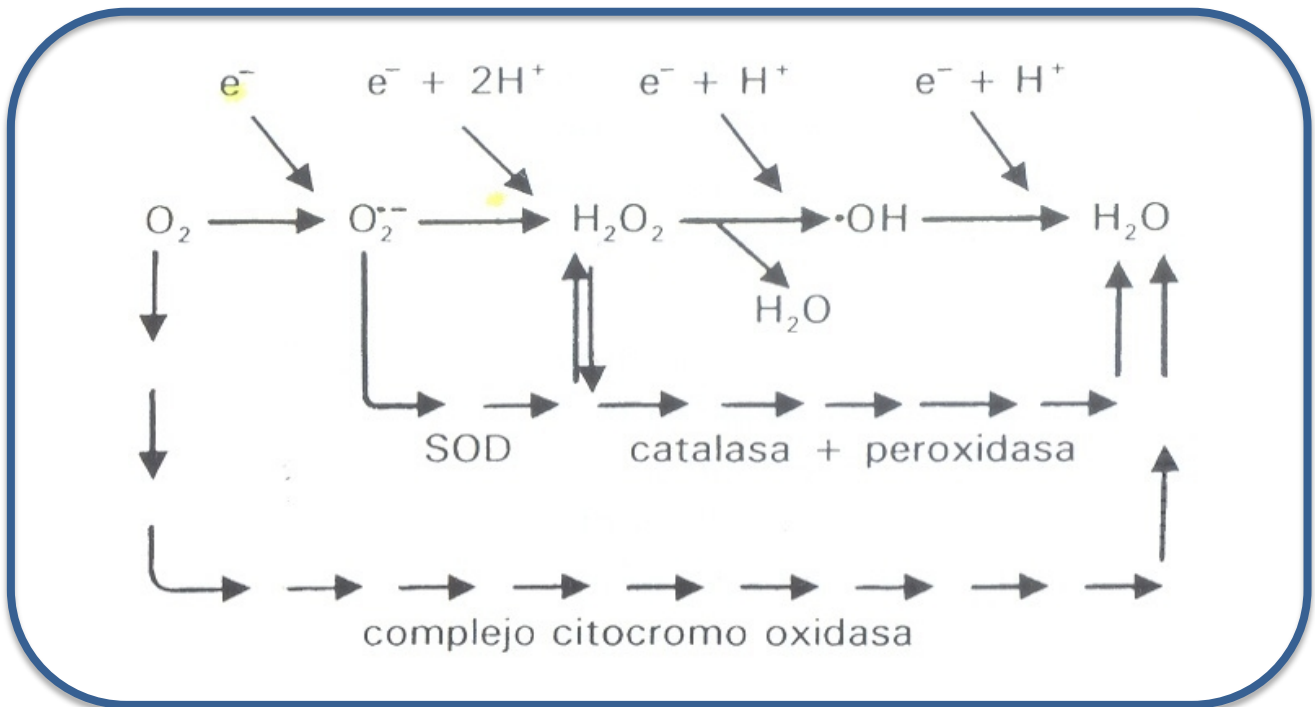
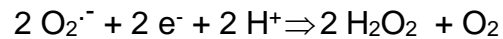


Figura 1. Generación de radicales libres de oxígeno por la reducción tetravalente del oxígeno a agua.

- ANIÓN SUPERÓXIDO ($\text{O}_2^{\bullet -}$)

El anión superóxido procede de la reducción univalente del oxígeno molecular (Fig. 1), y a diferencia de otros RLO solo es capaz de reaccionar eficazmente con un grupo reducido de moléculas (Halliwell 1996). Sin embargo, es muy importante en fisiopatología porque se genera en abundancia y sufre una conversión significativa hacia otras formas de RLO que son muy reactivas

y dañinas. El anión superóxido tiene una vida media de algunos milisegundos y es inestable. Pueden producirse reacciones espontáneas de dismutación, estas consisten en la reacción entre dos aniones superóxido para dar una molécula de peróxido de hidrógeno se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno y oxígeno.

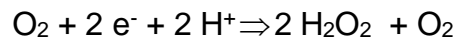


El anión superóxido puede producirse como resultado de muchas reacciones enzimáticas que implican a las deshidrogenasas flavoproteicas (xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc), oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo P450, etc). Pero además, cabe destacar como fuente de anión superóxido la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Donde se calcula que aproximadamente el 2% de los electrones transportados por la cadena respiratoria mitocondrial en estado 4, no llega al complejo IV, sino que escapan de esta cadena uniéndose al oxígeno para formar aniones superóxido (Boveris y Chance 1973).

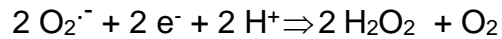
- PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂)

El peróxido de hidrógeno no es un radical libre realmente, pues no posee electrones desapareados en su capa de valencia. Es la forma menos reactiva de las especies reactivas de oxígeno. Su importancia se debe a que participa en numerosas reacciones que producen finalmente radicales libres y que además puede atravesar con facilidad las membranas biológicas y desplazarse dentro de toda la célula. Puede originarse por diferentes vías:

.. Reducción directa de una molécula de oxígeno por 2 electrones (Fridovich 1997):



.. Dismutación espontánea del anión superóxido (Cheeseman y Slater 1993):



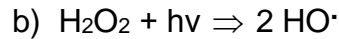
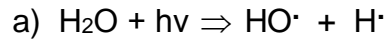
.. Producto de la acción de algunas reacciones enzimáticas: glucosa oxidasa, uricasa, etc (Fridovich 1986).

La eliminación del peróxido de hidrógeno se lleva a cabo por la acción de la catalasa, con formación de agua, un proceso que determinará su vida media en las células. Por otra parte, el peróxido de hidrógeno está implicado en la señalización para algunos factores de transducción como NFκβ que regulan la expresión de genes como: SOD, IL-2, TNF-α, etc.

- **RADICAL HIDROXILO (HO[·])**

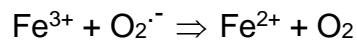
Es la especie derivada del oxígeno más reactiva que se conoce. Su vida media se estima en 10⁻⁹ segundos, debido a lo cual actúa muy cerca de donde se produce, reaccionando con la mayoría de las biomoléculas. El radical hidroxilo se genera a través de procesos muy variados (Cheeseman y Slater 1993):

.. Lisis del agua o del peróxido de hidrógeno por acción de las radiaciones ionizantes, pudiéndose formar *in vivo* a consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos γ) que pueden provocar la ruptura homolítica del agua corporal (a). La luz UV no tiene suficiente energía para escindir la molécula de agua, pero si puede escindir la molécula de peróxido de hidrógeno (b):



.. Reducción del peróxido de hidrógeno por iones de metales de transición (hierro y cobre):

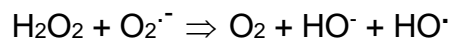
Primer paso: reducción del catión férrico a ferroso por un anión superóxido:



Segundo paso: Reacción de Fenton:



Reacción neta (Reacción de Haber-Weiss):



- RADICAL PEROXILO (ROO[·])

Especie reactiva de oxígeno formada a partir de hidroperóxidos, como lo son los lípidos o cualquier molécula con cadena ROOH por pérdida de hidrógeno. Tienen una vida media larga (segundos).

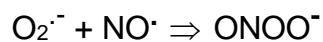
2.4. Especies reactivas del nitrógeno

El óxido nítrico (NO[·]) es un gas incoloro lipofílico e hidrosoluble, cuya vida media es relativamente larga (3-5 segundos). Contiene un electrón desapareado en su capa exterior, lo que le convierte en un radical libre. El NO[·] ha cobrado gran interés en los últimos años por su importancia en numerosos procesos fisiológicos. Su formación tiene lugar por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que cataliza la conversión de la L-arginina a L-citrulina, dando como producto NO[·] en numerosos tipos celulares (Moncada 1991). La

NOS necesita como sustrato L-arginina, oxígeno y NADPH para rendir, L-citrulina, NADP⁺, agua y NO[•]. La NOS, en realidad es una familia de 4 isoformas: neuronal (nNOS, neurotransmisor en SNC, SNP y músculo), endotelial (eNOS, produce vasodilatación) e inducible (iNOS, en el sistema inmune y cardiovascular) y la mitocondrial (mtNOS, en la matriz mitocondrial de muchos tejidos).

El NO[•] actúa activando a la guanilato ciclasa e incrementa el GMPc de las fibras musculares lisas del endotelio que a su vez fosforila las cadenas de miosina, relajando el musculo liso vascular y produciendo vasodilatación.

El NO[•] puede reaccionar con el anión superóxido para formar el peróxido de nitrógeno (ONOO⁻) o anión peroxinitrito, que no es un RLO, es muy reactivo y capaz de reaccionar con numerosas biomoléculas.



Los nitritos (NO₂⁻) y nitratos (NO₃⁻) son productos finales del metabolismo del óxido nítrico y del anión peroxinitrito (peróxido de nitrógeno), ambos están presentes en los fluidos biológicos y en la sangre. El estrés nitrosativo es la consecuencia de la acción directa del peróxido de nitrógeno sobre las moléculas biológicas. El peróxido de nitrógeno, es capaz de reaccionar con los residuos –OH de la tirosina (nitricación) o con grupos –SH de la cisteína (s-nitrosilación) en las proteínas. Pero también pueden reaccionar con los lípidos de membrana y con el DNA (Szabó 2007). La suma de ambos, nitritos más nitratos puede ser útil para medir de forma indirecta la producción de óxido nítrico, mediante la detección colorimétrica con el reactivo de Griess.

2.5. Fuentes de las especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres de oxígeno pueden ser de origen endógeno o

exógeno. Los descritos anteriormente son todos de origen endógeno y las que vamos a describir en este apartado. Aunque el organismo también está expuesto a RLO procedentes de fuentes externas como son los alimentos, el tabaco, la contaminación ambiental, el ozono, agentes antineoplásicos (bleomicina, adriamicina, etc), radiaciones ionizantes, hiperoxia, hidrocarburos aromáticos, etc.

La **cadena de transporte electrónico mitocondrial** es una de las principales fuentes endógenas generadoras de RLO en el interior de las células.

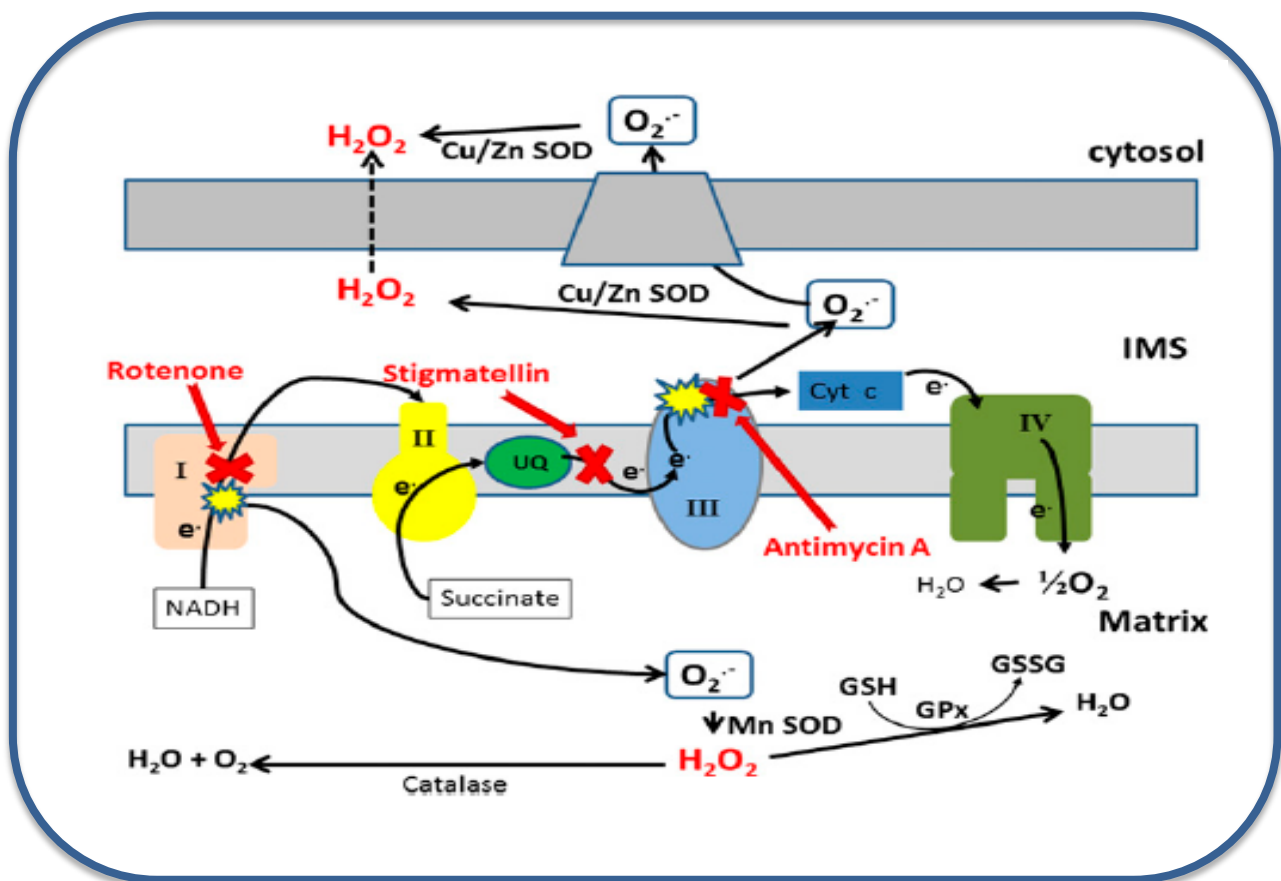


Figura 2. Generación de radicales libres de oxígeno por la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Se sabe que aproximadamente 2-3% de los electrones transportados por la cadena respiratoria mitocondrial no llegan al complejo IV para producir la reducción parcial del O_2 . El citocromo a_3 del complejo IV de la cadena

respiratoria mantiene estrechamente unidas todas las especies parcialmente reducidas del O_2 hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al O_2 y con ello la formación de 2 H_2O (Boberis y Chance 1973; Frei 1994). Se ha estimado que se producen del orden de 10^{10} moléculas de anión superóxido por célula y día.

La generación de radicales superóxido por las mitocondrias se produce cuando los complejos transportadores de electrones de la cadena respiratoria están altamente reducidos, esto se puede ocurrir normalmente en 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 y tienen la capacidad de transferir directamente un electrón al O_2 y formar un anión superóxido (O_2^-). A su vez este dará lugar a la formación de peróxido de hidrógeno (espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa (SOD)). El peróxido de hidrógeno es capaz de difundir al citoplasma y generar más RLO. Como en el interior de las mitocondrias no existe catalasa, el H_2O_2 puede difundir fuera de las mitocondrias o bien dar lugar a la formación de radicales hidroxilo ($HO\cdot$) en presencia de anión superóxido y de hierro (Fe^{2+}) mediante las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. La formación de este anión superóxido aumenta linealmente con la concentración presente en el medio (Ames et al. 1993).

El **sistema hipoxantina/xantina oxidasa** desempeña un papel importante en medicina, porque produce RLO durante los fenómenos de hipoxia/reperfusión. Durante la hipoxia, la xantina deshidrogenasa (XDH) en presencia de iones Ca^{2+} y un pH ácido y proteasas, pasa a xantina oxidasa (XO), permaneciendo a la espera de que exista oxígeno disponible. La hipoxantina procedente de la adenosina, con la aparición de la reoxigenación pasará a formar xantina por la acción directa de la XO que ya es activa y finalmente se formará ácido úrico. Pero esta serie de reacciones del sistema descrito, conlleva la formación de 2 aniones superóxido (Spector 1988; Harrison 2002).

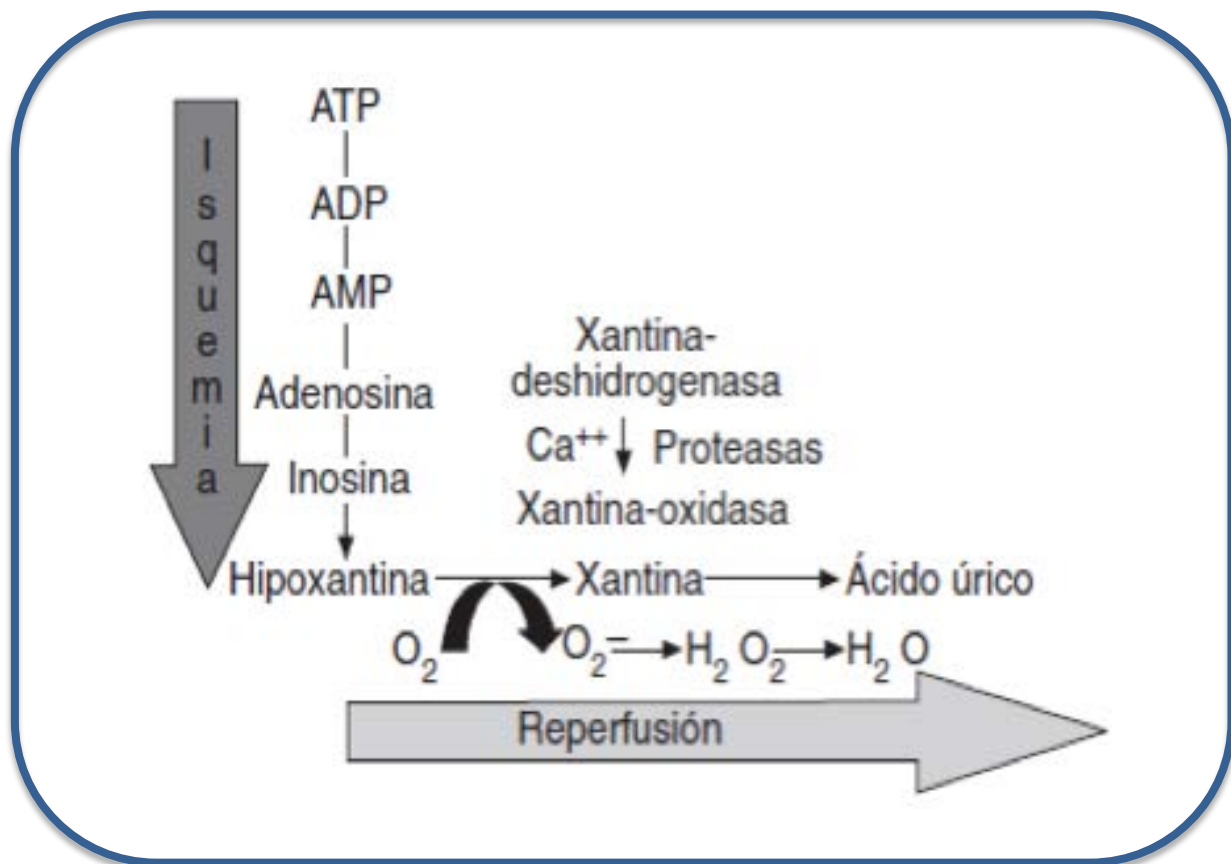


Figura 3. Generación de radicales libres de oxígeno por el sistema hipoxantina/xantina oxidasa.

Sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico, los cuales contienen los citocromos P₄₅₀ y b₅, que pueden oxidar ácidos grasos insaturados y xenobióticos. En particular, los citocromos P₄₅₀ (una amplia familia de proteínas con grupos hemo muy abundantes en los seres vivos) son considerados poderosos agentes oxidantes. Son monooxigenasas capaces de generar especies electrofílicas de oxígeno que pueden ser liberadas de las células (Philpot 1991).

Los **fagocitos activados** (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) poseen NADPH oxidasa que le permiten generar O₂^{•-}, H₂O₂ y finalmente ácido hipocloroso por acción de la mieloperoxidasa, como mecanismo para combatir a los microorganismos que morirán por oxidación (Babior 1978).

Los **microsomas o peroxisomas**, conjunto de vesículas membranosas con una concentración elevada de D-aminooxidasa y acetil-CoA oxidasa, utilizadas en la degradación de los ácidos grasos y aminoácidos, que producen peróxido de hidrógeno como un producto de las reacciones que catalizan (Boberis et al. 1972).

Diversas **enzimas** que contribuyen a la generación de especies reactivas de oxígeno. Citosólicas solubles como la aldehído oxidasa y la óxido nítrico sintasa. O bien enzimas unidas a la membrana plasmática, como la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, que participan en el metabolismo del ácido araquidónico, generando radicales libres de oxígeno (Frei 1994).

La **oxidación de biomoléculas**, por reacción directa con el oxígeno, siendo el anión superóxido (O_2^-) el principal radical libre formado (Halliwell 1994). Algunas de estas moléculas son la dopamina, la adrenalina y los tetrahidrofolatos (Fridovich 1986).

2.6. Sistemas antioxidantes: enzimáticos y no enzimáticos

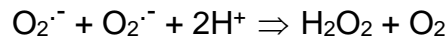
El estrés oxidativo afecta a todas las células aeróbicas y con el fin de protegerse, se han desarrollado en estas células una serie de mecanismos de defensa antioxidante enzimática y no enzimática. En 1995, Halliwell definió el término antioxidante como “cualquier sustancia que en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de ese sustrato” (Halliwell et al. 1995). Desde el punto de vista bioquímico, los antioxidantes se clasifican en antioxidantes enzimáticos y en antioxidantes no enzimáticos.

- ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

.. Superóxido dismutasa

Son una familia de metaloproteínas ampliamente distribuidas en la

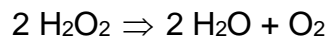
naturaleza y presentes en todas las células aeróbicas. Constituyen la primera línea de defensa al daño del anión superóxido y las especies reactivas que pueden derivar de él (Fridovich 1974). La superóxido dismutasa (SOD) cataliza el paso de la reacción que transforma el anión superóxido en peróxido de hidrógeno (McCord & Fridovich 1969).



En la especie humana, así como en el resto de mamíferos están presentes tres formas de SOD, dependiendo del grupo prostético metálico ligado a la enzima y su localización mayoritaria: SOD1, presente en el citoplasma (Cu, Zn), SOD2, presente en la matriz mitocondrial y SOD3, extracelular (Cu, Zn).

.. Catalasa

Esta enzima ferro-porfirínica participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno a través de una reacción que da lugar a agua y oxígeno (Evans 1907).

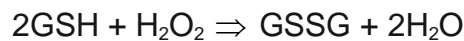


La catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas (Tolbert & Essner 1981) del hígado y los hematíes. Aunque también se ha descrito cierta actividad en la matriz de las mitocondrias y en el citosol.

.. Glutación peroxidasa

La glutación peroxidasa (GPx) es el nombre general de una familia de enzimas con actividad peroxidasa. La GPx juega un importante papel en la

detoxificación celular del peróxido de hidrógeno que reduce a agua y los lipoperóxidos que los reduce a los correspondientes alcoholes. Existen 2 tipos: GPx-selenio dependientes y GPx-no selenio dependientes. La principal actividad GPx se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer 1986). En la reacción antioxidante la GPx utiliza siempre glutatión reducido (GSH) y lo transforma en glutatión oxidado (GSSG), tal como se muestra en las siguientes ecuaciones:



- ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

.. Glutatión

El glutatión es el tiol no proteico más abundante en las células de los mamíferos, descubierto por Hopkins en 1921. Constituye el principal antioxidante endógeno no enzimático. Está constituido por 3 aminoácidos: ácido γ -glutámico, cisteína y glicina (γ -glutamil cisteinil glicina). Puede encontrarse en 2 formas, según su estado de óxido-reducción: reducido (GSH) u oxidado (GSSG): Este último es la combinación de 2 moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro (GS-SG). El grupo tiol (-SH) de la cisteína le confiere la capacidad de intervenir en reacciones redox; y el enlace γ -glutamilo le hace resistente a la degradación por las peptidasas celulares, siendo hidrolizable solamente por la enzima γ -glutamil transpeptidasa, situada en la membrana celular. El GSH es uno de los antioxidantes más abundantes de la célula y por lo tanto una primera barrera de protección frente al estrés oxidativo (Sies 1986). Se origina primariamente en el hígado y se encuentra principalmente en el citosol celular a concentraciones entre 0.1-10 mM, encontrándose en mayor cantidad en el hígado, bazo, riñones, eritrocitos y leucocitos. Sin embargo en el plasma sanguíneo las concentraciones de GSH

son relativamente bajas (2-20 $\mu\text{mol/l}$) porque el residuo de cisteína es rápidamente oxidado por los radicales libres para formar GSSG (Gilbert 1990).

Sin mediar intervención enzimática, el GSH puede reaccionar directamente con los RLO, pero también lo hace por medio de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), enzima clave en el ciclo redox del glutatión. En situación de estrés oxidativo, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la GPx. El GSSG formado puede ser reducido a GSH por medio de la enzima glutatión reductasa (GR). La GR requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Tanto la GPx como la GR se encuentran predominantemente en el citosol, existiendo cierta actividad en las mitocondrias. En 1985, Griffith y Meister descubrieron que el GSH que existe en las mitocondrias procede del citosol celular (Griffith & Meister 1985), siendo el antioxidante principal que utilizan las mitocondrias para contrarrestar los RLO que se producen constantemente en ellas. El GSSG es citotóxico, por lo cual tiene que ser eliminado de la célula o bien ser reducido por medio de la enzima GR y regenerándose nuevamente en GSH. El cociente GSSG/2GSH es el más importante acoplamiento redox celular, jugando un papel crucial en la protección antioxidante. Los niveles de glutatión en sangre pueden reflejar el status del glutatión en el cuerpo, incluyendo los niveles de otros tejidos menos accesibles. Por lo tanto la medida de los niveles en sangre de GSH y GSSG son considerados como un buen índice de daño oxidativo (Sies 1999; Griffith 1999; Wu et al. 2004).

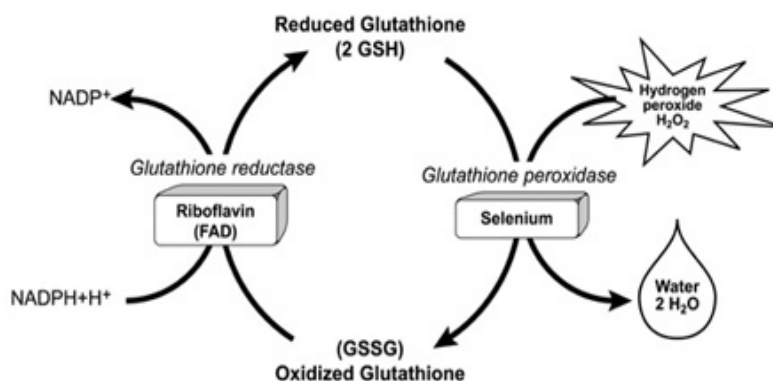


Figura 4. Representación esquemática del ciclo redox del glutatión.

.. Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico es considerado uno de los antioxidantes naturales más poderosos y menos tóxico (Bendich 1997). Es soluble en el agua y se encuentra en concentraciones elevadas en muchos tejidos. Las plantas y muchos animales pueden sintetizarla a partir de la glucosa, pero los humanos, los primates superiores y los cobayas no poseen la L-glucolactona oxidasa, enzima imprescindible para su síntesis. La vitamina C es un potente reductor, pierde con facilidad átomos de hidrógeno, oxidándose y transformándose en ácido deshidroascórbico, que sigue conservando su función de vitamina C. La ausencia prolongada de la vitamina C en la dieta, produce la enfermedad carencial denominada escorbuto. Tiene numerosas funciones fisiológicas esenciales que dependen fundamentalmente de sus propiedades de oxidoreducción y de su papel como cofactor de las enzimas hidroxilasas y monooxigenasas involucradas en la síntesis de colágeno, carnitina muscular y neurotransmisores. El ácido ascórbico reacciona con los RLO oxidándose a dihidroascorbato que se recicla a ácido ascórbico por la enzima dihidroascorbato reductasa. Es además capaz de regenerar la forma oxidada del tocoferol (toco-peroxilo) en tocoferol (vitamina E) (Machlin & Bendich 1987).

.. Vitamina E

Bajo esta denominación se incluyen una serie de compuestos fenólicos, 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles denominados alfa, beta, gamma y delta. El alfa-tocoferol es el más abundante (90%) en los tejidos. Son altamente lipofílicos, encontrándose mayoritariamente en las membranas biológicas y en las lipoproteínas plasmáticas. Los tocoferoles poseen actividad antioxidante, e impiden la auto-oxidación de los ácidos grasos muy insaturados presentes en los lípidos cuando se hallan expuestos al oxígeno molecular. En el caso de deficiencia de vitamina E, son detectables productos de auto-oxidación en los depósitos de grasa, en el hígado y en otros órganos. Se considera el antioxidante más potente del organismo y estabilizador de las membranas biológicas por bloquear la cadena de lipoperoxidación (Niki 1987). Secuestra los radicales peroxil lipídicos, dando hidroperóxidos lipídicos que serán

reducidos por la glutatión peroxidasa (dando glutatión oxidado) y un radical toco-peroxilo que será reducido por el ascorbato, regenerándose de nuevo la molécula de vitamina E.

.. Ácido úrico

El ácido úrico, se forma como producto final del catabolismo de las purinas y tiene un potente efecto antioxidante. Es hidrosoluble y se le atribuye hasta un 30% de la capacidad antioxidante total del plasma humano (Ames 1983).

.. Ubiquinona

La coenzima Q₁₀ o ubiquinona está presente en la mayoría las células eucariotas, especialmente en la cadena respiratoria mitocondrial de la que forma parte esencial entre los complejos II y III (Ernster & Dallner 1995).

.. Proteínas

La presencia de proteínas de almacenamiento y de transporte de iones metálicos en el medio extracelular proporcionan una defensa antioxidante importante (Freman & Grapo 1982). Ejemplos de estas proteínas son la haptoglobulina, la ferritina y la transferrina para el hierro y la ceruloplasmina para el hierro y el cobre. De esta manera el hierro y en menor medida el cobre no están disponibles para la síntesis del radical hidroxilo mediante la reacción de Haber-Weiss. La albúmina, la proteína plasmática más abundante, también actúa como un antioxidante, pues tiene una gran afinidad por los radicales libres de oxígeno y de nitrógeno en su residuo cisteína (Cys-34) que posee un grupo –SH libre (Oettl & Stauber 2007).

2.7. Estrés oxidativo y daño a las biomoléculas

- CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO

McCord y Fridovich en 1969 (McCord & Fridovich 1969) propusieron que la formación de especies reactivas de oxígeno eran una parte integral del metabolismo celular. La formación de radicales libres es un proceso normal e inevitable (Slater 1984), ya que son producto de numerosas reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. Estas especies reactivas de oxígeno pueden causar daño sobre las propias biomoléculas celulares, aunque las células en condiciones normales tienen un amplio sistema de defensas antioxidantes que mantienen un equilibrio entre la formación de especies reactivas de oxígeno y su neutralización. Pues bien, cuando en determinadas situaciones fisiológicas o patológicas se altera el equilibrio entre los agentes oxidantes y los antioxidantes a favor de los primeros, se produce una situación denominada *estrés oxidativo* (Sies 1986). Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por un exceso de agentes oxidantes, por un déficit de los agentes antioxidantes, o bien por la suma de ambos.

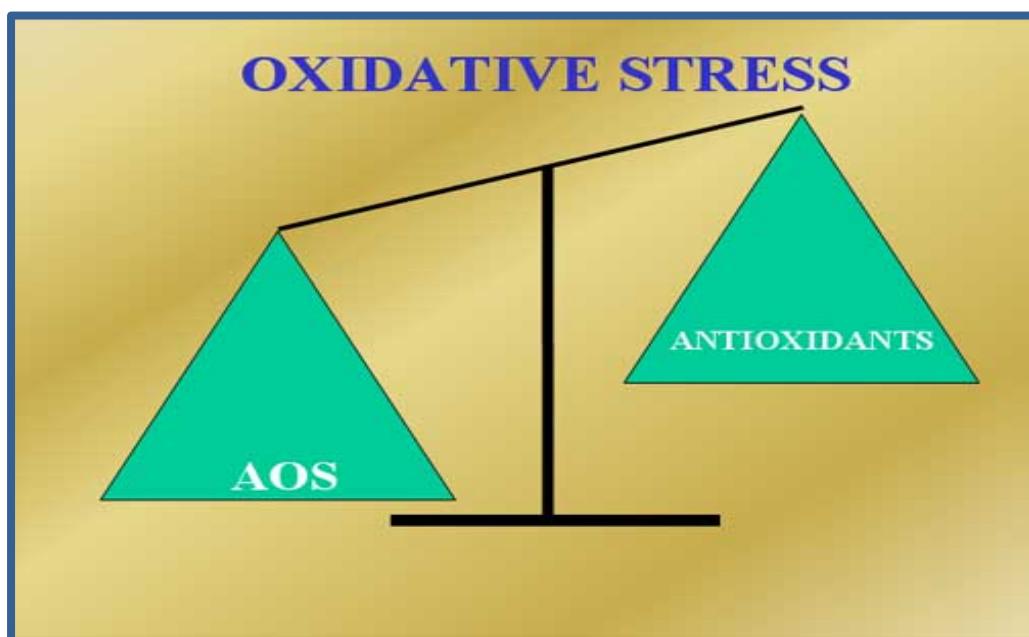


Figura 5. Desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes.

- DAÑO OXIDATIVO A LAS BIOMOLÉCULAS

Como consecuencia de la importancia que el estrés oxidativo tiene en el mantenimiento de una homeostasis celular y en el organismo, se han propuesto numerosos biomarcadores procedentes de la sangre, orina y células o tejidos, que se pueden cuantificar para poder detectar el grado de estrés oxidativo.

El estudio del grado de oxidación del **glutati6n** (GSH) en la sangre y en los tejidos constituyen un buen m6todo de estudio de la situaci6n de oxidoreducci6n celular. Pues como ya se ha comentado antes, el GSH (γ -glutamil cisteinil glicina) constituye el principal antioxidante celular no enzim6tico y principal barrera frente al estr6s oxidativo (Sies 1986). Pudi6ndose encontrar en estado reducido (GSH) o bien en estado oxidado (GSSG) por la combinaci6n de 2 mol6culas de GSH, unidas por un puente disulfuro. En situaciones fisiol6gicas, la concentraci6n en el citosol celular de GSH es muy superior a la de GSSG. Adem6s, es el antioxidante principal dentro de las mitocondrias. El GSSG es citot6xico, por lo tanto tiene que ser eliminado de la c6lula o bien ser reducido por medio de la enzima glutati6n reductasa y regenerandose nuevamente en GSH. El cociente GSSG/2GSH es muy importante, en la protecci6n antioxidante. Las concentraciones de glutati6n en sangre pueden reflejar el status del glutati6n en el resto del cuerpo. Por lo tanto la medida de las concentraciones en sangre de GSH y GSSG son considerados como un buen indice de da1o oxidativo (Sies 1999; Griffith 1999). Siendo un buen m6todo de estudio del estado redox la determinaci6n del cociente: glutati6n oxidado / glutati6n total, $[(2GSSG)/(GSH + 2GSSG)] \times 100$ expresado en porcentaje.

En relaci6n al da1o oxidativo a los **l6pidos**, los 6cidos grasos poliinsaturados son los m6s susceptibles de ser atacados por los radicales libres (Cheeseman & Slater 1993). Los radicales libres que pueden iniciar este proceso son el radical hidroxilo, el per6xido, el alc6xido y el alqu6lico. Este proceso se denomina peroxidaci6n lip6dica. Form6ndose una cadena alif6tica donde un carbono pierde un hidr6geno y da lugar a su vez a un radical alqu6lico

(R-CH^{*}). Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el oxígeno y forma un radical peróxido (R-COO^{*}), los cuales pueden reaccionar a su vez con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes dando un radical alquílico (R-CH^{*}) y un peróxido lipídico (R-COOH), siendo esta la forma de propagación en reacción en cadena (Halliwell 1994).

De modo que el ataque de un solo RLO da lugar a un gran número de sustancias, especialmente hidrocarburos de cadena corta: etano, pentano. Pero también son muy utilizados como buenos marcadores de lipoperoxidación los aldehídos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HN) (Freeman & Grapo 1982). Muchos de los aldehídos formados son tóxicos para el ADN, proteínas y disminuyen la fluidez de las membranas celulares (Frei 1994), en concreto el MDA es una molécula altamente tóxica para el organismo (Del Rio et al. 2005; Nair et al. 2007). Todos estos productos de la peroxidación lipídica pueden difundir lejos de su lugar de formación y causar inflamación endotelial y sistémica. El malondialdehído (MDA) (CHO-CH₂-CHO) puede reaccionar con el ácido tiobarbitúrico dando un compuesto que puede medirse espectrofotométricamente (MDA-TBA₂) el cual es un buen marcador de daño oxidativo de las membranas biológicas (Wong et al 1987).

El ácido araquidónico, es un ácido graso poliinsaturado de la serie omega-6, formado por una cadena de 20 carbonos con cuatro dobles enlaces. La presencia de dobles enlaces supone varios sitios potenciales de oxidación enzimática o química que, junto con un posterior reordenamiento, permite la formación de diferentes lípidos con distintas actividades biológicas. El ácido araquidónico forma parte de fosfolípidos de las membranas celulares, y es el precursor de la biosíntesis de eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos) por acción de la lipoxigenasa o la ciclooxigenasa. El ácido araquidónico puede sintetizarse a partir del ácido linoleico, uno de los ácidos grasos esenciales requeridos por la mayoría de los mamíferos.

El ácido araquidónico también puede sufrir la peroxidación por los RLO, independientemente de la acción de la enzima de la ciclooxigenasa (COX) y dar lugar a los isoprostanos (Roberts & Morrow 1997). Los cuales tienen una

estructura similar a las prostaglandinas (PG) y se originan in vivo especialmente en las membranas biológicas a partir del ácido araquidónico, pero también se pueden originar a partir de la esterificación de los ácidos grasos de las membranas biológicas (Morrow et al 1990a; Morrow et al 1990b; Morrow et al 1994). Siendo los responsables directos los RLO, formándose 4 isómeros de prostaglandina PGH₂. Cada uno de estos isómeros dan lugar a diferentes isómeros: PGE₂, PGF₂, PGD₂. De forma que se han identificado hasta 64 isómeros diferentes, conocidos colectivamente como F₂-isoprostanos por su similitud estructural con las prostaglandinas F_{2α}. La diferencia estructural principal de los isoprostanos con las prostaglandinas se encuentra en la orientación de la cadena lateral unida al anillo prostano. Orientación *cis* para los isoprostanos y *trans* para las prostaglandinas (Taber et al 1997).

Los F₂-isoprostanos son los más abundantes en los tejidos y actualmente se consideran los mejores marcadores de peroxidación lipídica inducida por los RLO, por ser estables y fácilmente cuantificables en muchos medios biológicos (plasma, orina condensado de aire exhalado, etc). Siendo el 8-isoprostano (8-isoPGF₂) el más utilizado como marcador biológico de peroxidación lipídica en la actualidad. Además la determinación de 8-isoprostano se ha propuesto como marcador evolutivo y pronóstico de numerosas patologías.

Los aminoácidos presentes en las **proteínas** tiene residuos que pueden ser atacados por los radicales libres de oxígeno y del nitrógeno. El daño oxidativo a las proteínas se realiza principalmente a nivel del grupo carbonilo del aminoácido. Los aminoácidos más susceptibles de ser alterados por acción de los radicales libres son la tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína. Este cambio en los aminoácidos puede dar lugar a un cambio conformacional o a la ruptura de las cadenas peptídicas y de la estructura de la proteína, y por lo tanto a la pérdida o a la modificación de su función (Davies 1987; Stadman 1992).

El **ADN** también es vulnerable de daño oxidativo y nitrosativo, pues los radicales libres pueden adicionarse a las bases nitrogenadas o bien los azúcares, la desoxirribosa o la ribosa. Estas reacciones dan un gran número de productos finales. La modificación oxidativa más frecuente suele ser a nivel de la guanosina, dando lugar a la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina. La cantidad de este producto de oxidación se considera como un buen índice del daño oxidativo al ADN. El ADN mitocondrial está mas expuesto al daño oxidativo que el ADN nuclear, pues carece de histonas que le protejan y además se encuentra mas cerca de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Hoeijmakers 2009; García de la Asunción et al 1999).

3. CONCEPTO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN (I-R)

Trastornos caracterizados por isquemia-reperfusión (I-R), tales como infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, siguen siendo una de las causas más frecuentes de enfermedad y muerte. Las lesiones tisulares y/o la muerte celular ocurren como resultado del insulto isquémico inicial, que es determinado principalmente por la magnitud y duración de la interrupción en el suministro de sangre, y el daño posterior inducido por reperfusión. Durante la isquemia prolongada, los niveles de ATP disminuyen drásticamente, se produce una disminución del pH intracelular como resultado del metabolismo anaeróbico y por la acumulación de lactato. Como consecuencia, los mecanismos de transporte de iones dependientes de ATPasa se vuelven disfuncionales, con un aumento de los niveles de calcio intracelular y mitocondrial (sobrecarga de calcio), apareciendo hinchazón celular, ruptura y finalmente la muerte celular por mecanismos necróticos, apoptóticos y autofágicos. A pesar de que los niveles de oxígeno se restauran tras la reperfusión, un gran aumento en la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y de los neutrófilos proinflamatorios infiltran los tejidos isquémicos para exacerbar la lesión isquémica. Los eventos patológicos inducidos por la I-R orquestan la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, que parece representar un efector final común de los eventos patológicos iniciado por I-R (Kalogeris et al. 2012).

3.1. Relación entre I-R y estrés oxidativo

En condiciones generales las situaciones que favorecen los efectos de I-R dan lugar a una situación denominada estrés oxidativo, o en el caso del NO[•], estrés nitrosativo (por especies reactivas de nitrógeno, ERN). La visión tradicional del estrés oxidante es que surge de un desequilibrio entre los niveles celulares de compuestos pro-oxidantes versus antioxidantes. Cuando existe un exceso neto resultante de compuestos pro-oxidantes y/o un déficit de antioxidantes, se producirá una lesión de células y tejidos (Sies 1986).

Durante la situación de isquemia, los tejidos isquémicos aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la cadena respiratoria mitocondrial, debido a que los citocromos respiratorios se reducen adquiriendo una situación redox que van a permitir que se transfieran electrones directamente al O₂ presente, que aunque más escaso no está ausente. Produciéndose de esta forma una gran cantidad de aniones superóxido (O₂^{•-}) especialmente a nivel de dos sitios de la cadena respiratoria, los complejos I y III (Chen et al. 2003; St-Pierre et al. 2002). Sin embargo con la llegada de oxígeno durante la reperfusión tisular, el sistema hipoxantina/xantina oxidasa va a tener un papel determinante, porque va a ser el principal generador de especies reactivas de oxígeno. Durante la isquemia, la xantina deshidrogenasa (XDH) en presencia de una alta concentración de iones Ca²⁺ y en presencia de un pH ácido y proteasas específicas, va a permitir el paso a xantina oxidasa (XO), permaneciendo a la espera de que exista oxígeno disponible. La hipoxantina procedente de la adenosina con la reoxigenación pasará a formar xantina y finalmente ácido úrico por la acción de la XO que ahora está activa con la presencia de oxígeno. Pero ello conlleva la formación de 2 aniones superóxido (Spector 1988; Harrison 2002) (ver Figura 3).

3.2. Lesión pulmonar por I-R

Los diferentes tejidos y órganos del cuerpo tienen su propio umbral de tolerancia o resistencia a las situaciones de déficit de aporte parcial o total de flujo sanguíneo y por lo tanto de oxígeno a las células que componen dichos órganos. El tejido pulmonar al igual que los demás órganos tiene su propio grado de tolerancia a la pérdida de flujo sanguíneo. Las lesiones pulmonares por I-R en el parénquima pulmonar puede producirse principalmente por patologías agudas o crónicas: traumatismos, neumotórax, arterioesclerosis y tromboembolismos pulmonares. Pero sobre todo, por los procedimientos quirúrgicos tales como las segmentectomías pulmonares, lobectomías pulmonares, y por los trasplantes pulmonares (de Perrot 2003). Respecto a estos últimos, por la relación directa de los fenómenos de I-R sobre la viabilidad del pulmón trasplantado, siendo la principal causa de morbimortalidad después del trasplante pulmonar (Chen & Date 2015).

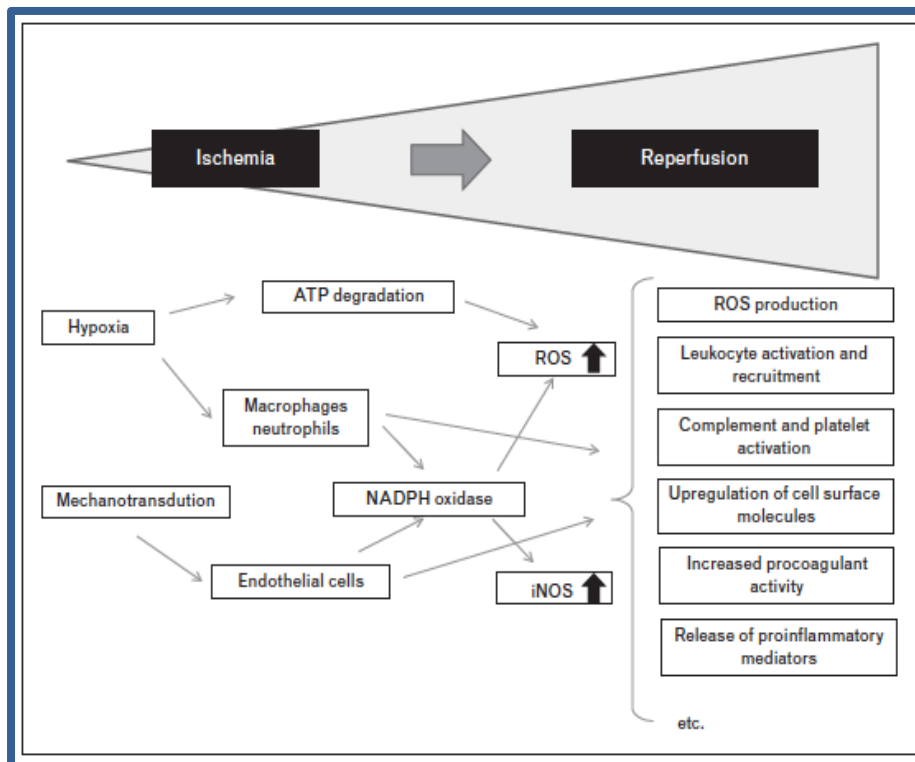


Figura 6. Esquema del daño pulmonar por isquemia-reperfusión (de Perrot 2003).

A pesar de que los pulmones poseen una aparente resistencia frente a la isquemia, debido a que el oxígeno alveolar contribuye a mantener en parte el metabolismo aeróbico, siempre que los pulmones estén bien ventilados. Durante la fase isquémica se producen dos mecanismos importantes que conducen a la estrés (Weyker 2012). Uno resulta de la acumulación de hipoxantina por la degradación del ATP, como producto debido a la isquemia. Y el otro depende del sistema de NADPH oxidasa, que esta presente principalmente en la superficie de la membrana de los neutrófilos, monocitos y macrófagos (de Perrot 2003). Además, el cese del flujo sanguíneo representa un evento físico que es detectado por el endotelio pulmonar y genera a una cascada de señalización que se ha denominado "mecano-transducción". La parada del flujo es detectada por un "mecano-soma", que se encuentra en las células endoteliales, conduciendo a la activación de NADPH oxidasa para generar ROS y a la activación de la óxido nítrico sintasa para generar óxido nítrico, con consiguiente aumento de la vasodilatación, que junto con el aumento de la generación de ROS proporciona una señal de revascularización. Pero la sobreproducción de ROS y el óxido nítrico pueden causar lesión y activación de las proteínas de inflamación y muerte celular (Chatterjee 2014). La mayoría de los estudios sugieren que es el proceso de reperfusión del injerto pulmonar, el que desempeña un papel más importante en la lesiones (de Perrot 2003). Las consecuencias del daño por I-R son diversas e incluyen la generación de ROS, activación leucocitaria y su reclutamiento, activación del complemento, activación plaquetaria, regulación positiva de las moléculas de la superficie celular, actividad pro-coagulante y liberación de mediadores proinflamatorios (Sayah 2015).

4. FISIOPATOLOGÍA DE LA LOBECTOMÍA PULMONAR

La cirugía torácica exige en la mayoría de ocasiones la necesidad de una toracotomía lateral y el colapso pulmonar del pulmón que va a ser intervenido. Para ello el paciente deberá permanecer en una posición de decúbito lateral que permita una adecuada exposición del pulmón a intervenir y facilite la labor del cirujano. Esta exigencia posicional y el colapso del pulmón intervenido (proclive o no dependiente) van a condicionar una situación de ventilación unipulmonar (VUP) o ventilación selectiva del pulmón declive o dependiente. Obviamente, esta situación de VUP va a suponer una serie de cambios en la ventilación (V) y también en la perfusión (Q) de ambos pulmones. Y por lo tanto en la relación ventilación/perfusión (V/Q).

4.1. Relación ventilación/perfusión (V/Q)

El flujo de sangre a los pulmones es el gasto cardiaco del ventrículo derecho, ligeramente menor que el gasto del ventrículo izquierdo. La diferencia se debe a la pequeña cantidad de sangre venosa coronaria que drena directamente al ventrículo izquierdo a través de las venas de Tebesio. El flujo sanguíneo pulmonar es directamente proporcional al gradiente de presión entre la arteria pulmonar y la aurícula izquierda e inversamente proporcional a la resistencia (R) de los vasos pulmonares ($Q = \Delta P/R$). Sin embargo, comparada con la circulación sistémica, la circulación pulmonar se caracteriza por las presiones y resistencias mucho más bajas, aunque el flujo de sangre es el mismo.

La regulación del flujo sanguíneo pulmonar se lleva a cabo principalmente modificando la resistencia de las arteriolas (como sucede en otros lechos vasculares) por cambios en el músculo liso arteriolar. El principal factor regulador del flujo sanguíneo pulmonar es la presión parcial de O_2 en el gas alveolar (PA_{O_2}). La disminución de PA_{O_2} provoca vasoconstricción de los vasos pulmonares (vasoconstricción hipóxica). Así el flujo sanguíneo pulmonar

se aleja de las regiones poco ventiladas del pulmón, donde el intercambio de oxígeno sería inadecuado y se dirige a zonas bien ventiladas, donde el intercambio de oxígeno es mejor. Es decir, permite reorientar la sangre venosa hacia los alveolos bien oxigenados sin cambiar la resistencia vascular pulmonar total. Si la PA_{O_2} se reduce a valores $<70\text{mmHg}$, las células del músculo liso vascular detectan esta hipoxia y se produce vasoconstricción y disminución del flujo sanguíneo por inhibición de la síntesis de óxido nítrico.

La distribución del flujo sanguíneo pulmonar no es uniforme debido a los efectos gravitacionales, disminuyendo la presión hidrostática de forma vertical y ascendente. Siendo menor en el vértice pulmonar (zona 1) y es mayor en la base (zona 3). Se distinguen por lo tanto 3 zonas teóricas en los pulmones en función de la perfusión recibida, llamadas zonas de West (West 2008):

- Zona 1: corresponde a los vértices, la presión alveolar (PA) que es aproximadamente igual que la presión atmosférica, es mayor que la Pa (presión arterial) y la Pv (venosa), por lo tanto apenas hay perfusión, es decir la zona 1 se convierte en un espacio muerto fisiológico.

- Zona 2: es la zona media pulmonar, aquí la Pa es mayor que la PA y que la Pv, es por tanto la situación ideal.

- Zona 3: se encuentra en las bases pulmonares, aquí el efecto gravitacional eleva las presiones de la Pa y la Pv, superando ambas a la PA. Por lo tanto es una zona donde existe un efecto *shunt* relativo.

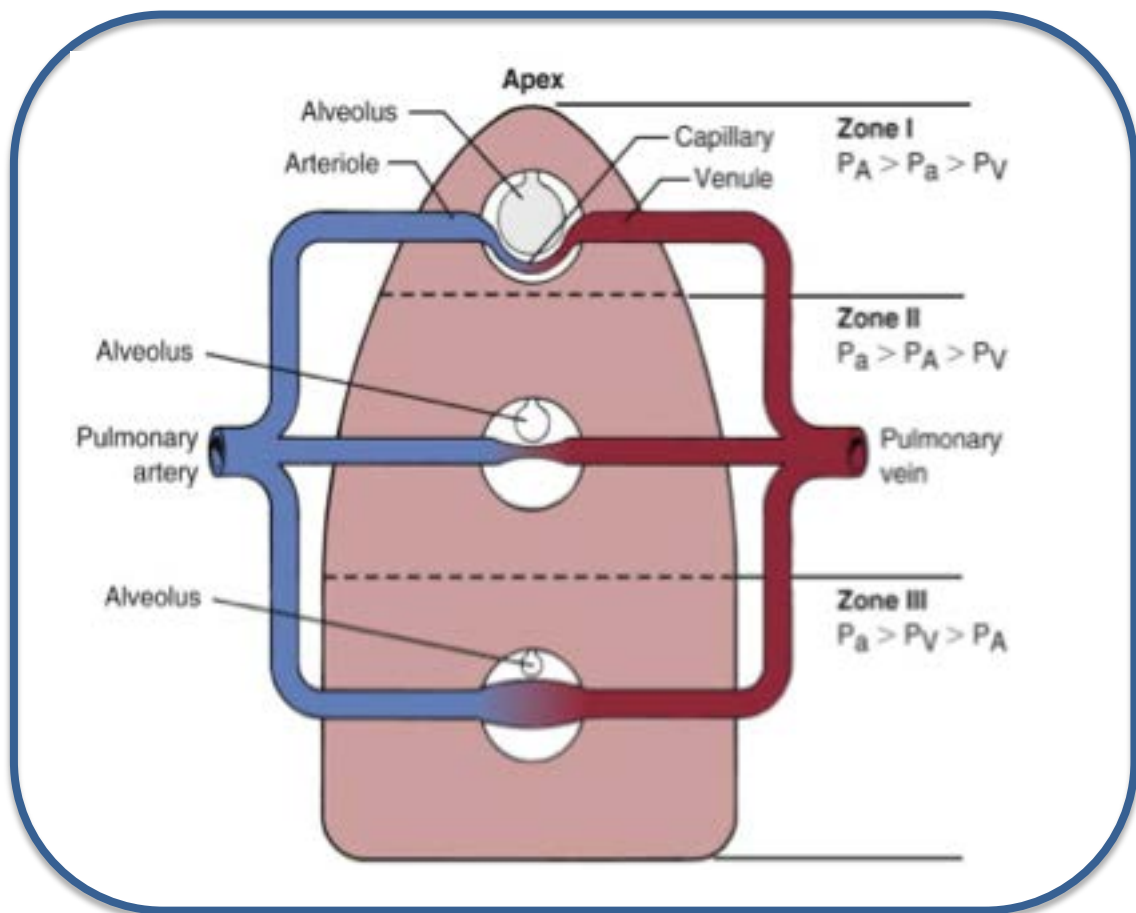


Figura 7. Distribución del flujo sanguíneo pulmonar.

La relación ventilación/perfusión (V/Q) tiene importancia decisiva para el intercambio ideal de gases: es inútil ventilar alveolos no irrigados o irrigar alveolos no ventilados. El valor normal de V/Q es 0.8. Esta cifra significa que la ventilación alveolar (L/min) es 80% del valor del flujo sanguíneo (L/min). Este es un valor promedio para todo el pulmón, pero es desigual en las tres zonas del pulmón, lo mismo que el flujo sanguíneo. Por lo tanto tienen consecuencias sobre la PaO_2 (130 mmHg en la zona 1 y 89 mmHg en la zona 3) y $PaCO_2$ (28 y 42 mmHg respectivamente). La ventilación es menor en la zona 1 y mayor en la zona 3. Aunque las variaciones regionales de la flujo sanguíneo no son tan amplias como las variaciones de ventilación. Por tanto la relación V/Q es mas alta en la zona 1 y mas baja en la zona 3.

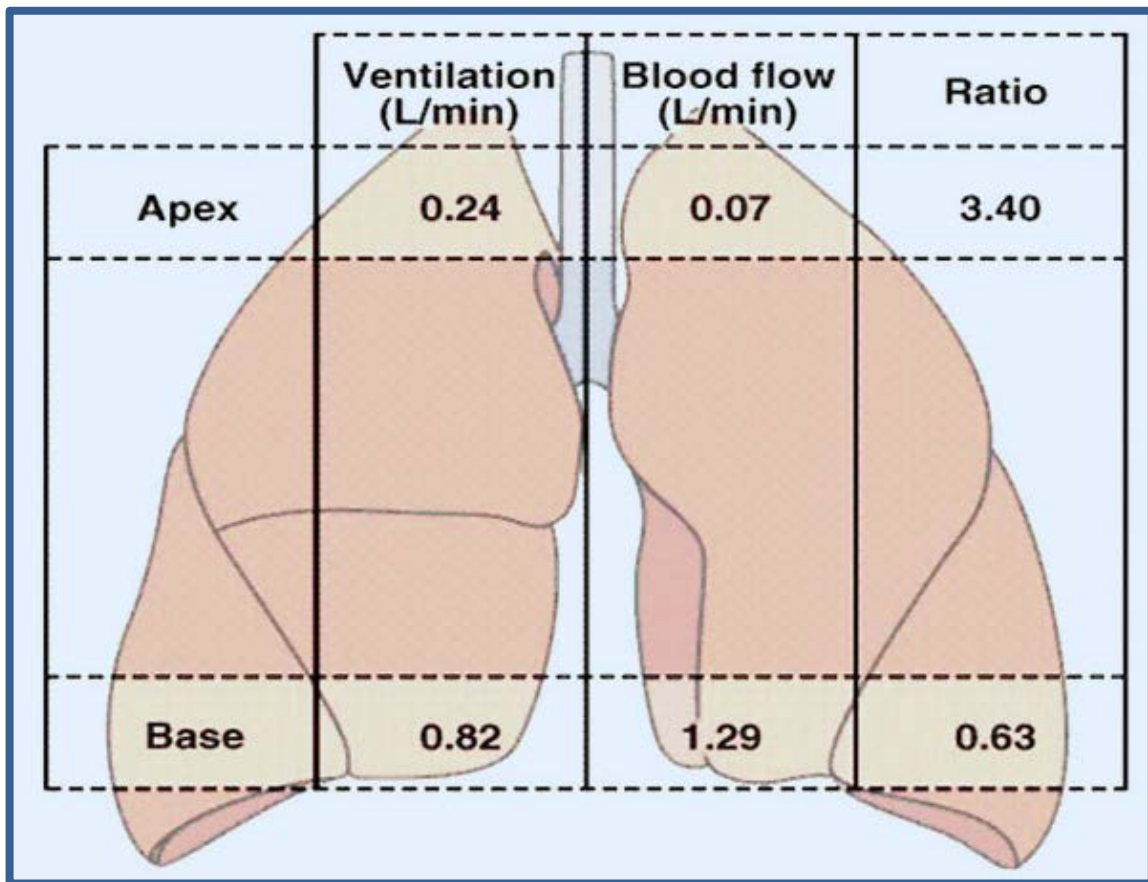


Figura 8. Variaciones de la relación ventilación/perfusión (V/Q).

4.2. Relación V/Q durante la lobectomía pulmonar

Con un paciente anestesiado, relajado y con ventilación mecánica con presión positiva y colocado en decúbito lateral, se produce un cambio importante en la perfusión pulmonar debido a la gravedad, de tal modo que el pulmón declive o dependiente recibirá aproximadamente un 60% del total de la perfusión pulmonar. Cuando el paciente está en decúbito lateral, anestesiado, con relajación muscular, tórax abierto al aire y ventilación mecánica con presión positiva unipulmonar (VUP). En este caso la perfusión también es más elevada en el pulmón dependiente por efecto de la gravedad, no modificándose por la toracotomía. Con el colapso pulmonar, el pulmón no dependiente o proclive está sin ventilación pero mantiene una pequeña parte de perfusión a pesar de la vasoconstricción hipóxica y el colapso pulmonar y la tortuosidad vascular. En

esta situación se produce un *shunt* derecha izquierda que puede ser aproximadamente del 20% al desviar parte de del flujo sanguíneo del pulmón proclive al pulmón declive o dependiente, el cual puede disminuir por acción de la vasoconstricción hipóxica (Morgan 2006; Abe 1998).

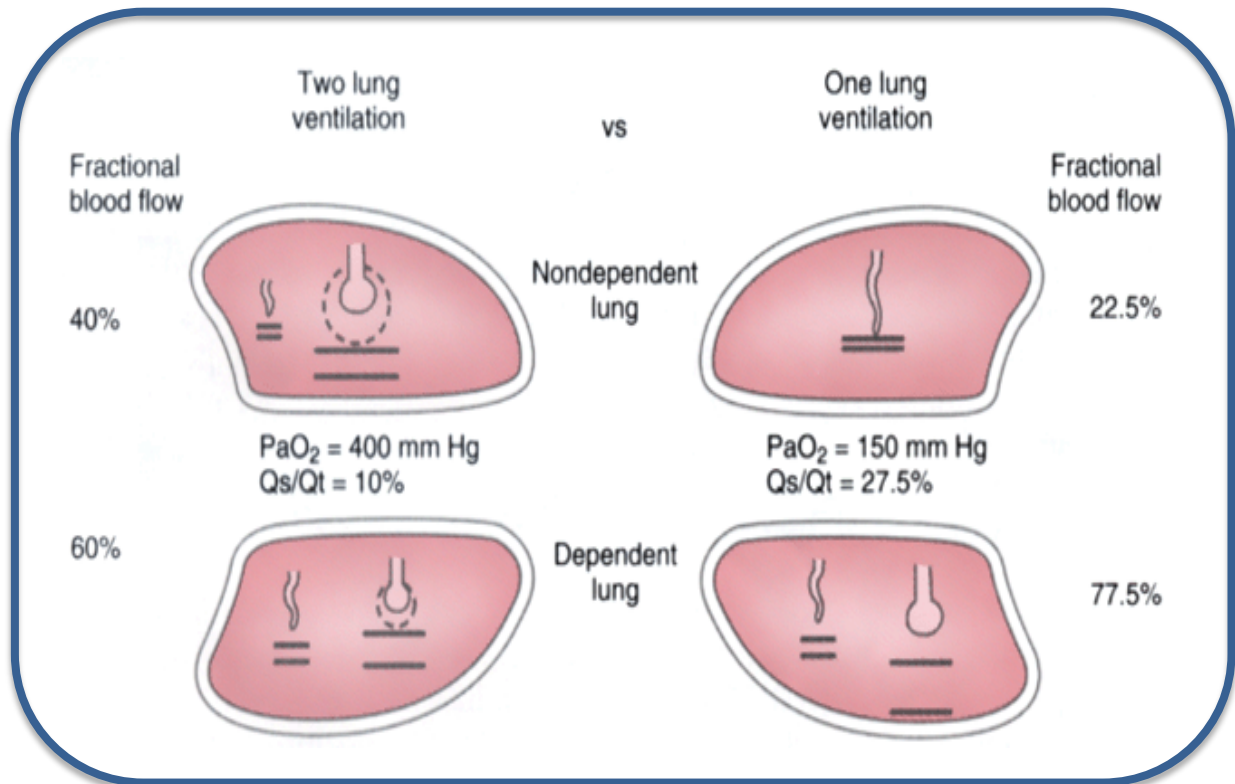


Figura 9. Cambios en la relación V/Q durante la lobectomía pulmonar.

4.3. Daño pulmonar inducido por la lobectomía

El daño pulmonar es una potencial complicación de la resecciones pulmonares, tanto en las lobectomías pulmonares como en las neumonectomías, con una tasa de mortalidad del 2% y del 6% respectivamente (Boffa et al. 2008). El edema pulmonar post lobectomía o post neumonectomía puede complicar el período post-operatorio inmediato de estos pacientes de una forma menos severa (ALI) o de una forma más grave, el síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), según el grado de afectación de la oxigenación traducida por los valores del cociente PO₂/FiO₂.

La necesidad de colapsar el pulmón patológico durante la lobectomía, supone que el pulmón sufra una situación de hipoperfusión tisular con la

consiguiente vasoconstricción hipóxica, empeorando aún más la situación. Posteriormente, tras la lobectomía se expande el pulmón operado y se produce un fenómeno de reperfusión, lo cual supone un daño pulmonar adicional. En este contexto de I-R, el estrés oxidativo es muy importante y genera daño tisular responsable al menos en parte de la patogénesis del daño pulmonar post lobectomía (Williams et al. 1998; Jordan et al. 2000, Lases et al. 2000; Sivrikoz et al. 2002). Se ha demostrado que en las lobectomías el daño oxidativo es mayor que las neumonectomías, puesto que tras la reexpansión persiste el daño oxidativo por reperfusión del pulmón intervenido (Williams et al. 1998; Lases et al. 2000). Los pulmones son órganos especialmente sensibles frente a las agresiones y muy reactivos en los procesos de estrés oxidativo, tanto de origen sistémico como el originado en el mismo pulmón (Perrot et al. 2003; Chow et al. 2003; Cheng et al. 2006). Recientemente, se ha demostrado que los ERO estimulan las metástasis por vía linfática favoreciendo la linfangiogénesis en microambiente tumoral (Tsukioka et al. 2012).

La ventilación mecánica unipulmonar con presión positiva del pulmón dependiente, conlleva un aumento de la agresión de la barrera alveolo-capilar y es la causante de un respuesta inflamatoria muy importante. Misthos et al. correlacionan el nivel de estrés oxidativo (midiendo los niveles de malondialdehído en suero) con la duración de la ventilación unipulmonar (Misthos et al. 2005; Misthos et al. 2006). Pero además, consideran que la ventilación unipulmonar de más de una hora de duración es un factor de riesgo independiente para la aparición de complicaciones clínicas como arritmias cardiacas (Misthos et al. 2005; Misthos et al. 2006). En este sentido, experimentalmente se ha visto en cerdos que la ventilación unipulmonar resulta en una significativa alteración del cociente V/Q, acompañado de una hiperperfusión y un daño alveolar en el pulmón dependiente, lo cual puede contribuir a trastorno del intercambio gaseoso alveolar después de la cirugía torácica (Kozian et al 2008).

Por lo tanto, los factores comunes que pueden ser origen del daño pulmonar y que pueden originar las complicaciones que pueden acontecer después de una lobectomía se pueden resumirse en: 1) un duración

prolongada de la VUP; 2) isquemia-reperfusión del pulmón colapsado, con incremento del estrés oxidativo, más intensa cuanto mayor sea el período de VUP; 3) efectos de una FiO_2 elevada (100% en ocasiones) en el pulmón dependiente, aumentando el daño oxidativo en el epitelio alveolar; 4) la VUP con volúmenes corrientes elevados (>8 ml/Kg); 5) estrés de los capilares alveolares por los efectos de la distensión y compresión repetidas; 6) liberación sistémica de mediadores pro-inflamatorios desde los macrófagos y neutrófilos locales peri-alveolares (Baudouin 2003), como se ha podido observar muy recientemente, con un aumento de TNF- α y IL-6 en el postoperatorio inmediato tras la lobectomías pulmonares (Li et al 2014).

5. CONDENSADO DE AGUA EXHALADA (CAE)

La colección de condensado de agua exhalada es un método no invasivo, sencillo y económico para la obtención de muestras de procedencia alveolar y bronquial para el estudio de diferentes patologías. El CAE contiene una gran número de biomarcadores, incluyendo marcadores de estrés oxidativo, mediadores inflamatorios y derivados del ácido araquidónico, tales como, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, nitritos, nitratos, glutatión, citokinas inflamatorias, leucotrienos, prostaglandinas, etc. Las concentraciones de estos biomarcadores en el CAE están directamente relacionados con las patologías pulmonares y pueden ser modificados por las intervenciones terapéuticas. Similarmente, en el CAE también se puede determinar su pH, el cual puede ser indicativo de cambios patológicos en las vías aéreas (Horváth et al. 2005; Liang et al. 2012).

Durante la exhalación las moléculas volátiles (p. e. óxido nítrico) y el vapor de agua difunden directamente como gases a una fina capa de fluido que recubre los espacios alveolares y los bronquiolos y posteriormente pasan a los gases espiratorios. Pero además, durante la fase espiratoria de la respiración, se liberan pequeñas partículas de aerosol, con un diámetro medio de 0.3 μ m posiblemente por las turbulencias originadas, aunque el mecanismo de formación no está totalmente dilucidado. Estas partículas de aerosol sirven de vehículo para el transporte de las moléculas no volátiles (p. e. nitritos y nitratos,

isoprostanos, leucotrienos, citokinas, etc.) pasando al aire exhalado y terminado posteriormente en el condensado de agua exhalada (Horváth et al. 2005; Liang et al. 2012).

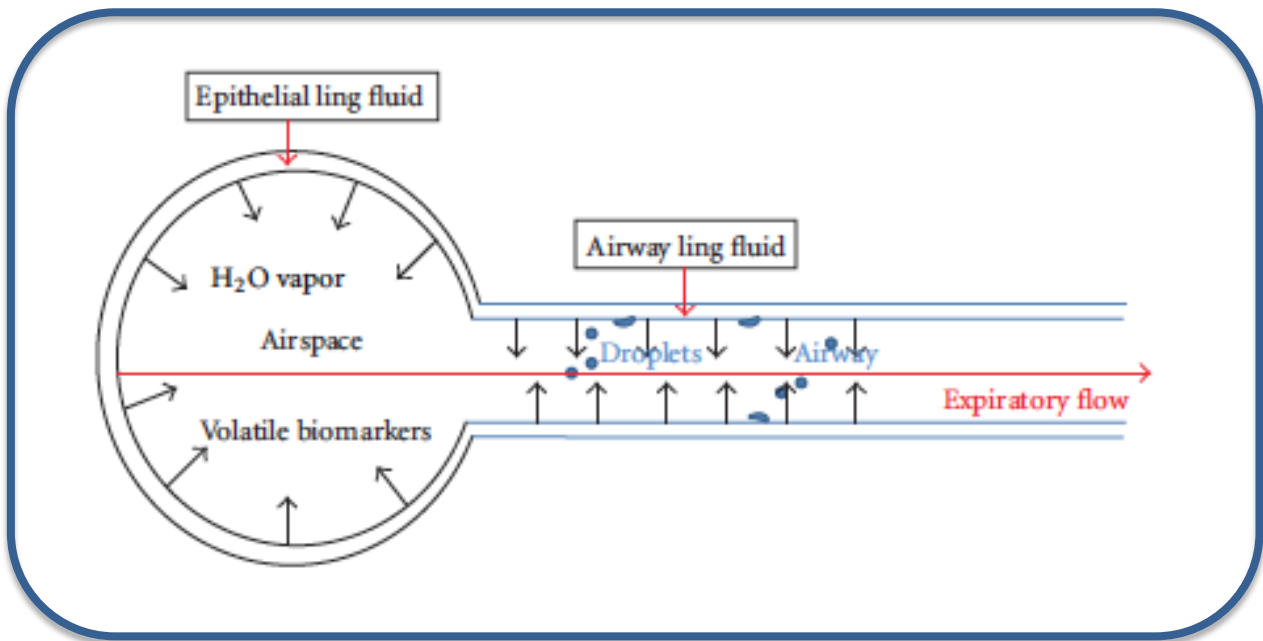


Figura 10. Formación de componentes volátiles y no volátiles en el CAE (Liang et al. 2012).

La composición del CAE, es reflejo de la composición del líquido extracelular del revestimiento celular alveolar y bronquial, estando constituido por dos fases. Una **fase gaseosa**, en la cual se puede detectar varios tipos de moléculas volátiles de origen endógeno como óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂), aldehídos (malondialdehído, 4-hidroxinonenal, etc), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), etc. Y una **fase acuosa**, donde se pueden encontrar numerosas moléculas no volátiles: iones como sodio, potasio, urea, glutatión, nitritos y nitratos, leucotrienos, prostaglandinas, péptidos, citokinas, etc.). Todas las muestras recogidas deben ser congeladas y almacenadas inmediatamente a -70 ó -80 °C hasta el momento de ser analizadas. También deben realizarse si es posible varias alícuotas, porque las congelaciones y descongelaciones repetidas de una única muestra pueden producir cambios en las moléculas como prostaglandinas, leucotrienos y H₂O₂

(Horváth et al. 2005; Liang et al. 2012). El pH del CAE depende del equilibrio entre las bases y los ácidos producidos en las vías aéreas. El valor del pH del CAE puede verse muy afectado por las concentraciones de CO₂ presentes en el CAE, el cual es el principal componente no volátil del aire exhalado. Por lo tanto es muy recomendable la eliminación del CO₂ del CAE con un gas libre de éste (argón, nitrógeno, oxígeno, etc.) para eliminar todo el CO₂ existente dentro de la muestra antes de medir el valor del pH, puesto que el CO₂ acidifica mucho el CAE (Antus & Barta 2011). El valor del pH no se ve afectado por la duración de la congelación de las muestras (Horváth et al. 2005; Liang et al. 2012).

La ventilación mecánica controlada por volumen es recomendable porque el volumen tidal siempre está ajustado al peso y porque todo el aire se exhala en cada espiración de una forma repetida con una misma frecuencia respiratoria. Pero además, se aplica en pacientes con intubación endotraqueal, evitándose así la contaminación del CAE con la saliva y las secreciones procedentes de la boca, faringe y nasofaringe. También es recomendable el control y la igualdad de la temperatura corporal, la similitud en la hidratación del paciente, un diseño similar del sistema de condensación del agua exhalada, la temperatura de enfriamiento del sistema de recogida del CAE y los materiales empleados en el sistema de condensación (Horváth et al. 2005).

Los sistemas para la recogida del CAE los constituyen básicamente, un tubo espiratorio conectado a un sistema de enfriamiento del agua exhalada, normalmente con hielo o un metal enfriado previamente. El sistema tiene que mantenerse a una temperatura constante de 0 °C ó < 0 °C a través del cual pasará el aire exhalado (normalmente cámaras de cristal o polipropileno). Todo el aire exhalado pasará por una tubuladura (teflón o polipropileno), al final de la cual se instala un recipiente mantenido a 0 °C, donde finalmente se recoge el agua condensada. El tiempo de recogida del CAE en los adultos suele oscilar entre 10-20 minutos, durante el cual se pueden recoger entre 1-3 ml. Se ha descrito que el volumen de CAE recogido en un tiempo determinado está linealmente relacionado con el volumen expirado, por lo cual se ha sugerido que se mantengan constantes las frecuencias respiratorias y los volúmenes

tidal ajustados al peso del paciente para estandarizar estos aspectos (Gesser et al 2001; Horváth et al. 2005; Horváth et al. 1998).

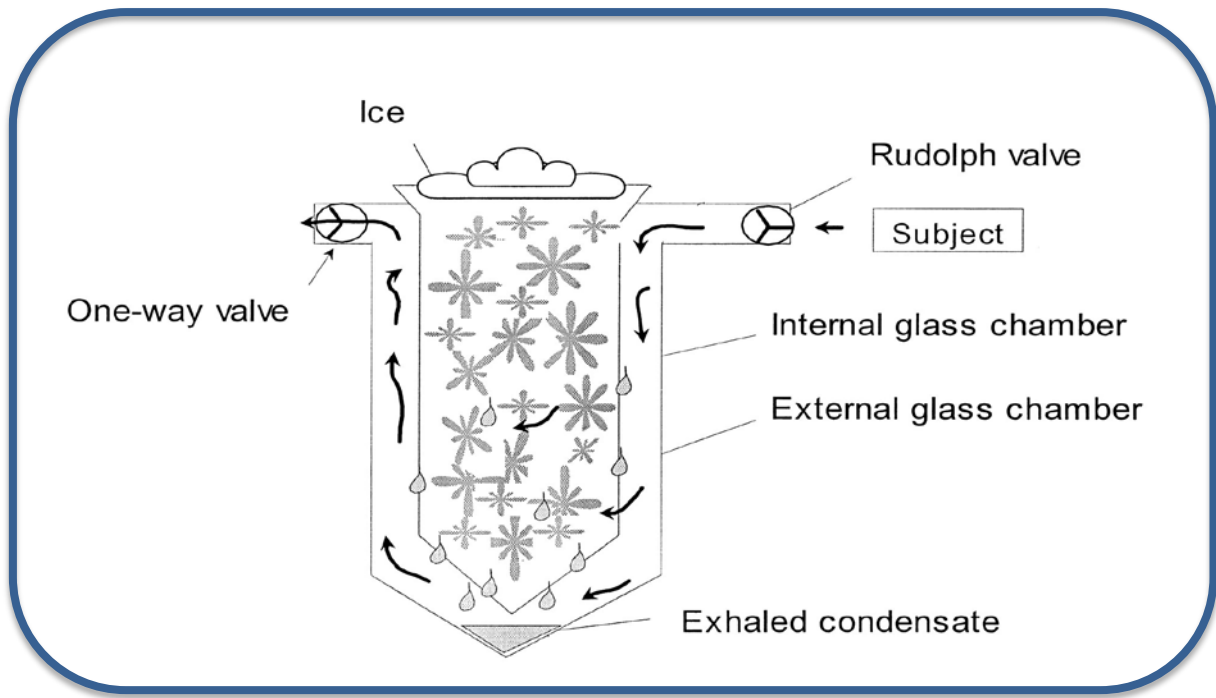


Figura 11. Esquema de un dispositivo para la recogida de CAE (Horváth et al 1998).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Durante la lobectomía pulmonar en los pacientes intervenidos por cáncer de pulmón, el pulmón intervenido permanece colapsado e hipoperfundido. La privación de oxígeno es acompañada de vasoconstricción reactiva por hipoxia pulmonar. Tras la lobectomía, el pulmón operado es inmediatamente reexpandido y reperfundido, a lo cual se le atribuye un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Pero además se sabe que durante el período de colapso pulmonar, el pulmón dependiente o no intervenido sufre una agresión por la ventilación unipulmonar.

Nosotros planteamos la siguiente hipótesis de trabajo: durante el período de colapso e hipoperfusión pulmonar asociado a la ventilación unipulmonar, se produce daño oxidativo pulmonar; pero además, después de la reexpansión-reperfusión pulmonar, se produce un incremento del daño oxidativo pulmonar. Este incremento del estrés oxidativo pulmonar, va a originar un aumento simultáneo de los niveles de algunos marcadores de estrés oxidativo en sangre y en el agua exhalada pulmonar.

Pero además, pensamos que los niveles de los marcadores de estrés oxidativo aumentados seguirán una correlación directa con la duración del colapso del pulmón intervenido y de la ventilación unipulmonar.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente estudio fue investigar en los pacientes con cáncer pulmonar sometidos a una lobectomía pulmonar, si existe un aumento del daño oxidativo durante el período del colapso pulmonar y ventilación unipulmonar, y posteriormente durante la reexpansión pulmonar. Para ello nosotros hemos medido por primera vez los niveles de 8-isoprostano, H_2O_2 y $NO_2^-+NO_3^-$ en el CAE a diferentes tiempos (*time course*). Pero además, también hemos medido los niveles de 8-isoprostano, $NO_2^-+NO_3^-$ en el plasma sanguíneo a diferentes tiempos, y muy especialmente durante la ventilación unipulmonar y durante la fase de reexpansión pulmonar.

También hemos determinado si los niveles de H_2O_2 (un pro-oxidante) se correlacionan directamente con los niveles de 8-isoprostano y $NO_2^-+NO_3^-$ en el CAE. Pero también si estos valores se correlacionan inversamente con los valores del cociente PO_2/FiO_2 en la sangre arterial para detectar alteraciones en la oxigenación de estos pacientes.

En otro estudio, de similares características al anterior, también con pacientes sometidos a lobectomía pulmonar por cáncer de pulmón. Se ha estudiado la oxidación del glutatión y la lipoperoxidación como consecuencias del daño oxidativo pulmonar. Para ello, se han determinado los niveles de glutatión reducido, glutatión oxidado y malóndialdehído en plasma, y su posible correlación con los valores del cociente PO_2/FiO_2 en la sangre arterial antes y después de la ventilación unipulmonar.

METODOLOGÍA

IV. METODOLOGÍA

1. PACIENTES

Esta tesis doctoral se ha realizado a partir de los resultados obtenidos en dos estudios previos, unicéntricos, prospectivos y observacionales. Cuyos resultados describen los efectos del fenómeno de isquemia-reperfusión y el estrés oxidativo resultante en pacientes con cáncer de pulmón sometidos a una lobectomía pulmonar electiva y que han sido publicados recientemente (García-de-la-Asunción et al. 2015; García-de-la-Asunción et al. 2016).

Estos dos estudios independientes, han reunido un total de 60 pacientes, 28 pacientes en un estudio (García-de-la-Asunción et al. 2015) y 32 en el otro estudio (García-de-la-Asunción et al. 2016). Estos dos estudios, han cumplido las características referentes a la información a los pacientes y los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la Declaración de Helsinki (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones posteriores. Además cumplen los acuerdos del Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a las aplicaciones de la biología y de la medicina (Paris 12-01-1998, ratificado el 23-07-1999). Los 2 estudios han sido aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Todos los pacientes estudiados estaban diagnosticados de cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadios I y II programados para lobectomía pulmonar. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: embarazo, menores de 18 años, la administración previamente de quimioterapia o radioterapia, la ingesta de vitaminas antioxidantes, presencia de infecciones sistémicas activas, fiebre de $>38^{\circ}\text{C}$, adicción a drogas, malnutrición, pérdida de peso corporal $>20\%$ en los últimos 2 meses y la negativa del paciente a participar en el estudio. Cada paciente fue informado previamente e ingresó en el estudio voluntariamente, firmando el correspondiente consentimiento informado.

2. ANESTESIA Y MONITORIZACIÓN

Previamente a la inducción anestésica y en todos los casos, se insertó un catéter epidural torácico en el nivel T4-T5 ó T5-T6 para la analgesia intraoperatoria, pero principalmente para la analgesia postoperatoria. La anestesia general se indujo de forma intravenosa, mediante un hipnótico, el tiopental sódico (3-5 mg/kg) y un opiáceo, el fentanilo (1-3 µg/kg). La intubación endotraqueal se realizó con un tubo selectivo de doble luz izquierdo del tamaño apropiado (37 a 39 F, Covidien IIC, Masfield, MA). La intubación fue facilitada mediante el uso de un relajante muscular, el bromuro de rocuronio (0.6 mg/kg). La correcta intubación se confirmó mediante el uso de un fibrobroncoscopio (BF-MP60, Olympus, Tokio, Japón). La anestesia se mantiene durante la intervención mediante anestesia inhalatoria con sevoflurano al 2%, además de fentanilo cuando fue necesario y bromuro de rocuronio para el mantenimiento de la relajación muscular. Tras la inducción de la anestesia general se canalizó con un catéter la arteria radial para monitorizar de forma invasiva la presión arterial y para tener un acceso para la toma de muestras de sangre arterial. Posteriormente, los pacientes se colocaron en decúbito lateral. Durante la intervención, se monitorizaron además la saturación de oxígeno por pulsioximetría, frecuencia cardíaca, y el valor del *end-tidal* del CO₂.

Durante la ventilación bipulmonar (VBP), se utilizó un volumen tidal de 7-8 ml/kg de peso ideal y una frecuencia respiratoria de 12-14 ciclos/minuto con una relación I:E (inhalación : exhalación) de 1:2 en los tiempos de cada ciclo ventilatorio. Cuando el hemitórax proclive es abierto al aire y pulmón proclive es colapsado para realizar la lobectomía pulmonar, entonces la ventilación unipulmonar (VUP) se realiza con un volumen tidal de 5-6 ml/kg de peso ideal y con una frecuencia de 14-18 ciclos/minuto para mantener un end-tidal de CO₂ <40 mmHg. En ambos estudios utilizamos una PEEP (positive end-expiratory pressure) de 5-7 cm de H₂O y una fracción de oxígeno inspiratorio del 50% (FiO₂ 0.5) durante la VBP y la VUP. Solamente en el caso de una disminución de los valores de la saturación de oxígeno en la pulsioximetría <92%, se permitiría que se realizase un aumento momentáneo en la FiO₂; pero siempre después de no conseguir una mejoría de la saturación tras realizar varias

maniobras de reclutamiento del pulmón dependiente, la comprobación de una correcta posición del tubo de doble luz con el fibroscopio y descartar complicaciones de tipo hemodinámico. Si a pesar de las maniobras citadas se mantenía la hipoxemia (saturación <92%), se realizaba una ventilación de ambos pulmones (VBP) y los pacientes en tales casos deberían salir del estudio. La administración de fluidos se realizó de forma estándar para este tipo de cirugía y a criterio del anestesiólogo responsable. En general, la administración de cristaloides fue <10 ml/Kg/h.

Después de finalizar la lobectomía pulmonar, los pulmones proclives que habían sido intervenidos, fueron de nuevo reexpandidos por insuflación con presión positiva de 25 cm de H₂O durante varios segundos para asegurar la completa reexpansión pulmonar antes de cerrar la toracotomía. Posteriormente, los pacientes no fueron despertados hasta completar el estudio del condensado de agua exhalada pulmonar (CAE), permaneciendo intubados hasta la toma de la última muestra de CAE en la Unidad de Reanimación (García-de-la-Asunción et al. 2015). Todos los pacientes fueron transferidos a la Unidad de Reanimación, donde permanecieron al menos 24 horas. En esta Unidad se les administró oxígeno a través de una mascarilla facial (Ventimask) con FiO₂ de 0.5, además de ser monitorizados: presión arterial invasiva, saturación de oxígeno (pulsioximetría), gasometrías arteriales, radiografías de tórax y ECG. Los criterios seguidos para el diagnóstico postoperatorio de ALI/ARDS, fueron los de la American-European Consensus Conference on ARDS guidelines (Bernard et al. 1994): 1) súbito inicio del cuadro de distrés respiratorio, 2) infiltrados radiológicos bilaterales característicos de edema pulmonar, 3) hipoxemia de aparición aguda, con valores de PaO₂/FiO₂ de <300 para ALI y <200 para el ARDS, 4) ausencia de edema agudo de pulmón por insuficiencia cardíaca o por sobrecarga de líquidos.

3. PROTOCOLO QUIRÚRGICO

El cáncer de pulmón, al que se le confirió por primera vez el estado de epidemia global en la década de los años 1950, sigue siendo una de las principales causas de muerte relacionada con el cáncer tanto en hombres como en mujeres a nivel mundial. La cirugía sigue siendo la base del tratamiento en los cánceres de pulmón distintos del cáncer de células pequeñas en estadio temprano (estadios I y II) (véase ANEXO 3) y ofrece la mejor probabilidad de curación, siendo la lobectomía pulmonar la resección anatómica convencional y más habitual.

El abordaje quirúrgico que se utilizó para la lobectomía pulmonar en todos los pacientes fue la toracotomía anterolateral. Para lo cuál, se colocó al paciente en decúbito lateral izquierdo o derecho (según el hemitórax a intervenir) con el brazo en posición del “nadador” con unos 90° de abducción para permitir fácil acceso a través del 5º espacio intercostal, normalmente.

Se realizó una incisión de 10-15 cm, aproximadamente 1 cm por detrás del músculo pectoral mayor, transcurriendo a lo largo del borde superior de la costilla. Apertura de piel y fascia de Scarpa. A continuación, se procedió a la apertura del músculo serrato anterior a lo largo de sus fibras. Se preservó el músculo dorsal ancho, conservando así una mejor función del hombro en el postoperatorio, que unido a que es una incisión más pequeña que la toracotomía posterolateral, hace que la recuperación sea algo más rápida. Una vez expuesto el plano costal, se procedió a la liberación de los músculos intercostales del borde posterior de la costilla inferior implicada en la toracotomía, para no lesionar en paquete intercostal. Una vez abierta la cavidad torácica se comprobó el correcto colapso pulmonar y se colocó un separador costal o de Finochietto y se exploró el tórax, para poder comprobar una posible afectación pleural parietal o diafragmática (no diagnosticada en los estudios de imagen preoperatorios). A continuación, se exploró el parénquima pulmonar con el objetivo de confirmar la localización de la lesión tumoral y descartar la existencia de otras lesiones. Tras la exploración, el siguiente paso fue la liberación del ligamento triangular y la liberación de las adherencias

pleurales, en aquellos casos que existiesen mediante disección roma y electrocauterio. En ningún caso se precisó liberación extrapleural.

Con el pulmón ya libre, el siguiente paso fue la apertura de pleura mediastínica en sus caras anterior y posterior para conseguir una correcta exposición de las estructuras del hilio pulmonar y proceder a su disección. Extremando la precaución de evitar el nervio frénico. Normalmente, la disección hilar comenzó por la vena pulmonar correspondiente al lóbulo intervenido, referenciándose con el *vessel loop* y realizando sutura mecánica con endograpadora Echelon Flex™ (Ethicon, Johnson&Johnson). En los casos de lobectomías superiores derechas, se procedió a identificar y preservar la vena del lóbulo medio.

Tras la sección de la vena, se continuó con la disección arterial, justo sobre la capa adventicia, se referenció con *vessel loop* y sección de las ramas arteriales correspondientes al lóbulo intervenido mediante sutura mecánica con endograpadora o entre las ligaduras, en el caso de ramas arteriales de pequeño calibre. Una vez controlados los vasos, se disecó de manera cuidadosa el bronquio y se extirparon los ganglios peribronquiales tanto para la estadificación como para permitir un mejor cierre bronquial. A continuación, se seccionó con sutura mecánica con endograpadora. Y por último se seccionó el parénquima pulmonar con disparos secuenciales de la endograpadora siguiendo la dirección de la cisura, completándose así la lobectomía pulmonar.

A continuación, se realizó linfadenectomía sistemática del mediastino. El control de la hemostasia y de las fugas aéreas, se realizó cuidadosamente, aplicando sellantes en algunos casos. Colocación de drenaje/s torácico/s del calibre 24 Fr, uno o dos según la complejidad del caso, la calidad del parénquima pulmonar y las preferencias del cirujano y conexión a un sistema de Pleur-Evac®. Para finalizar, tras el correcto contaje del material por parte del personal de enfermería y comprabarse adecuada reexpansión pulmonar, se realizó el cierre estándar de la toracotomía con tres puntos percostales, el cierre de la musculatura por planos y del tejido celular subcutáneo y finalmente el cierre de la piel con grapas.

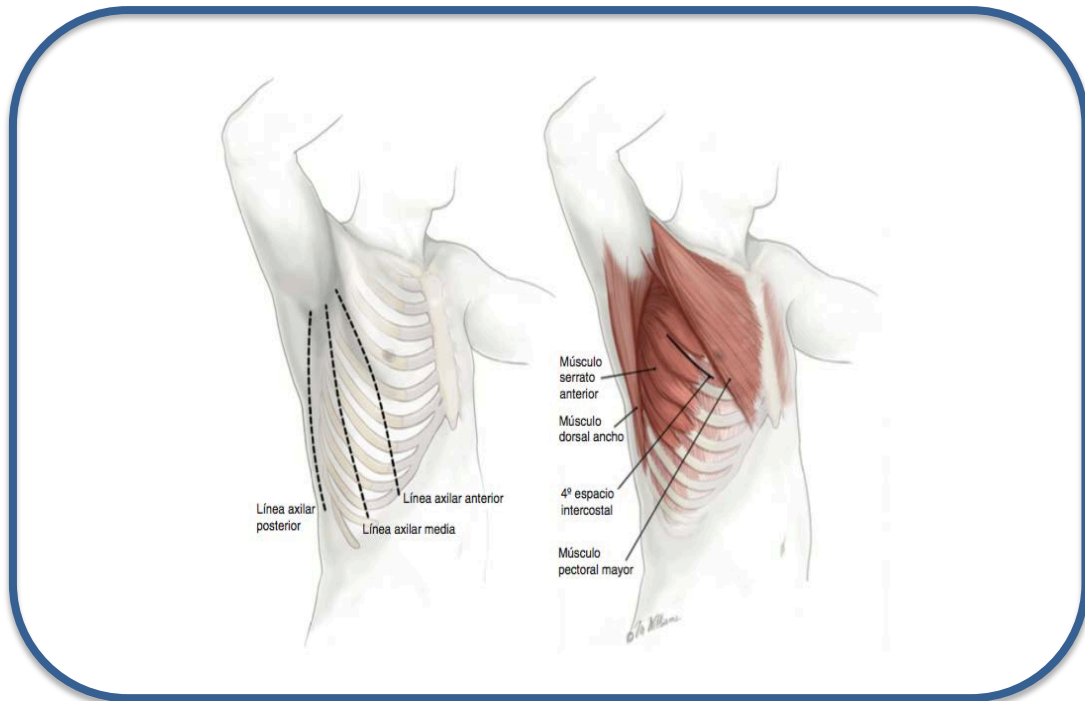


Figura 12: Líneas axilares anterior, media y posterior relacionadas con los músculos extratorácicos. Incisión de toracotomía anterolateral por debajo del pectoral mayor y delante del dorsal ancho.
(Cirugía del tórax. Sugarbaker. Ed. Panamericana, 2011)

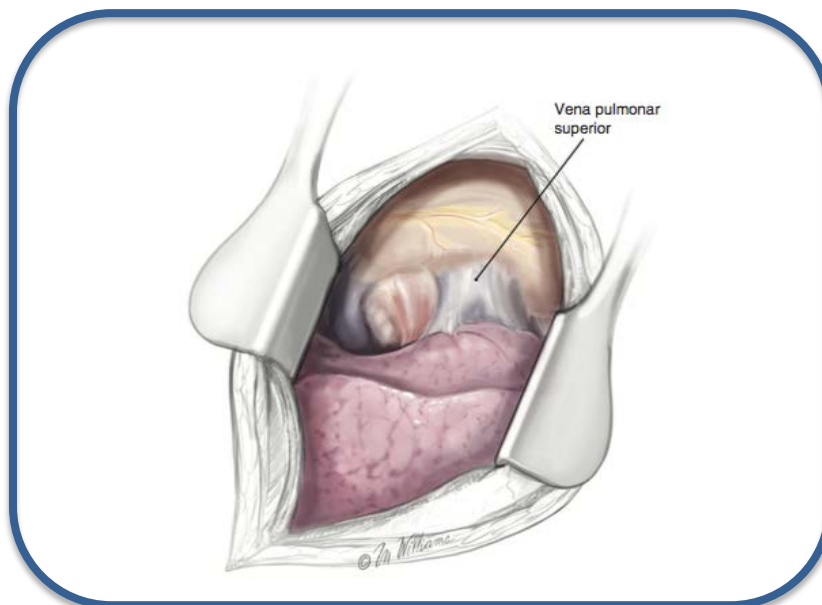


Figura 13-A: Vista del hilum pulmonar en una toracotomía anterolateral.

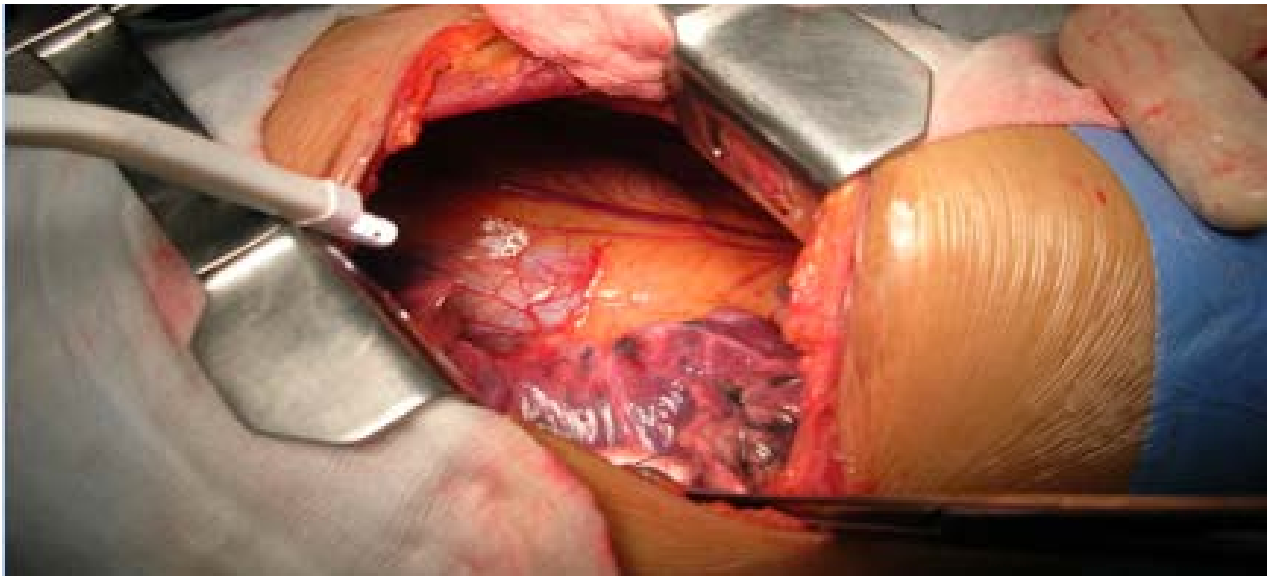


Figura 13-B: Vista del hilio pulmonar en una toracotomía anterolateral.



Figura 13-C: Toracotomía anterolateral.

4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

A todos los pacientes se les extrajeron 5 muestras de sangre de la arteria radial previamente canalizada en los siguientes tiempos: T0, preoperatoriamente (basal); T1, durante la VUP, 5 minutos antes reiniciar la VBP; T2, 5 minutos después de reiniciar la VBP; T3, 60 minutos después de reiniciar la VBP y finalmente T4, 180 minutos después de reiniciar la VBP. Estos tiempos incluyen el período quirúrgico y post-quirúrgico (en la Unidad de Reanimación). Todas las muestras de sangre se recogieron en tubos BD Vacutainer PST II con heparina de litio (BD-Plymouth, UK). Las muestras se conservaron en un frigorífico hasta finalizar las tomas de las 5 muestras. Posteriormente, la sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 12 min. Se separó el plasma sobrenadante en cada caso y se almacenaron las muestras de plasma a -80°C hasta el momento del análisis. El pH de la sangre arterial, PaO_2 , presión parcial de dióxido de carbono (PaCO_2) y la relación $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (un parámetro útil para detectar la alteración del intercambio alveolar de gases y la oxigenación) se midieron con un aparato ABL 88 Flex (Radiometer, Dinamarca).

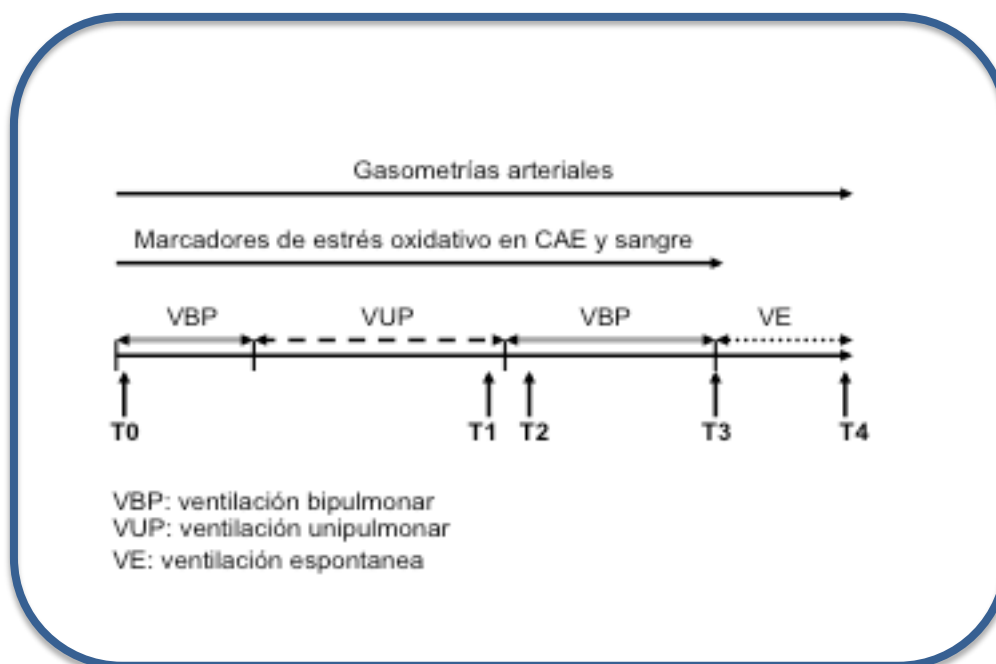


Figura 14. Esquema de los tiempos de recogida de muestras.

5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CAE

El condensado de agua exhalada (CAE) obtenido de un subgrupo de 25 pacientes, de un total de 28 pacientes del estudio previamente citado (García-de-la-Asunción et al. 2015) fue recolectado a través de un sistema de recogida en frío. Sistema que consistió en una cámara de vidrio de doble pared, enfrizada con hielo húmedo en su interior y conectada al puerto expiratorio del ventilador, y con un colector en la parte inferior para el agua condensada. Se recogieron aproximadamente, 2 ml de CAE en cada uno de los siguientes 5 tiempos: T0, preoperatorio (basal); T1, durante los 20 min de VUP, inmediatamente anteriores a la reinicio de la VBP; T2, durante los 20 minutos inmediatamente después del reinicio de la VBP; T3, 60 min después del reinicio de la VBP y T4, 180 minutos después del reinicio de la VBP.

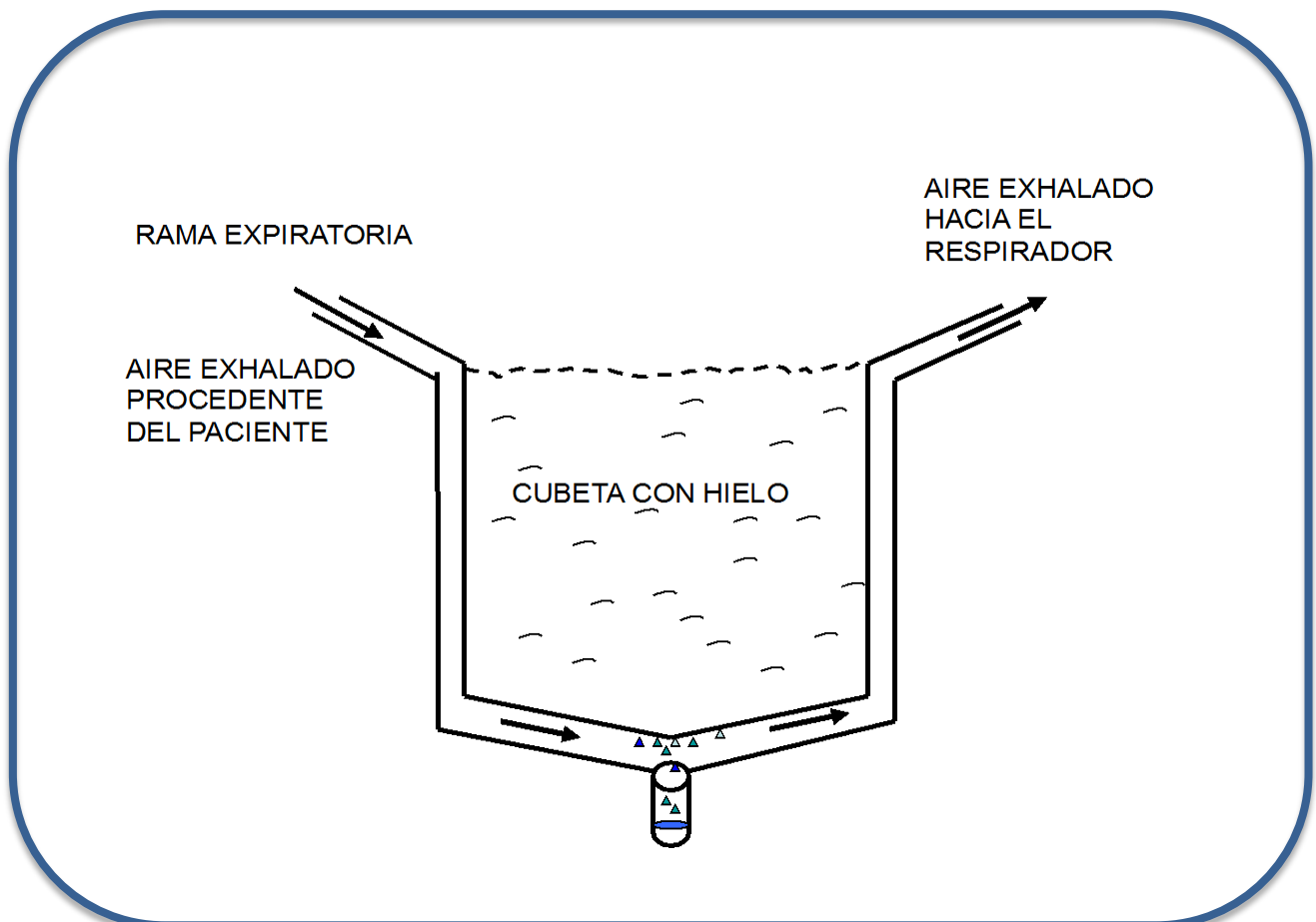


Figura 15. Sistema de recogida del CAE (García-de-la-Asunción et al. 2015).

Todas las muestras de CAE fueron sometidas a un burbujeo con argón (350 ml/minuto, durante 10 min) para eliminar todo el CO₂ existente en las muestras, para que no afectara al valor del pH (Horváth et al. 2005; Moloney et al. 2004; Nannini et al. 2013; Liang et al. 2012). El pH de el CAE se midió en una alícuota de 0,4 ml con un analizador de gas en sangre (Aparato ABL 88 Flex, Radiometer, Copenhagen, Dinamarca). Las muestras de CAE fueron almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

6. MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

6.1. Determinación de 8-isoprostano en el plasma sanguíneo y en el CAE

Los niveles de 8-isoprostano (8-iso-PGF₂α), un producto similar a las prostaglandinas, es estable y formado a partir de ácido araquidónico por la acción directa de las ERO (Janssen 2001), se midieron utilizando un inmunoensayo competitivo enzimático (kit EIA Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, EE.UU.). Menos de la mitad del total plasmático de 8-iso-PGF₂α está presente como un ácido libre. La mayor parte de ella está esterificada en los fosfolípidos. Por lo tanto, la determinación de los niveles totales de 8-iso-PGF₂α en plasma requieren hidrólisis alcalina antes del inmunoensayo enzimático (Morrow et al. 1995). Este método permite cuantificar la concentración de 8-isoprostano en plasma, suero, orina, sobrenadante de cultivos celulares y otros fluidos biológicos. El fundamento de este ensayo, está basado en la competición entre el 8-isoprostano de la muestra biológica y el trazador (conjugado de 8-isoprostano con acetilcolinesterasa) por los puntos de unión de los anticuerpos policlonales de conejo específicos anti 8-isoprostano.

Puesto que, la concentración del trazador de 8-isoprostano permanece constante, mientras que la concentración de 8-isoprostano en la muestra biológica es variable. La concentración del trazador disponible para unirse al anticuerpo de conejo será inversamente proporcional a la concentración de 8-isoprostano de la muestra biológica en cada pocillo.

La determinación de los valores de 8-isoprostano en el plasma sanguíneo y en el CAE se realizaron todas por duplicado en placas de 96 pocillos y siguiendo las indicaciones del fabricante. Cada pocillo está previamente recubierto con anticuerpos monoclonales de ratón anti- IgG de conejo y proteínas bloqueantes para evitar uniones inespecíficas. Luego se añaden las muestras con los 8-isoprostanos libres y el trazador (anticuerpos policlonales anti 8-isoprostano de conejo unidos a acetilcolinesterasa. Tanto el 8-isoprostano libre como los unidos al trazador se unen a los anticuerpos monoclonales anti IgG de conejo. Luego la placa se lava para eliminar los reactivos no unidos. Posteriormente se añade el reactivo de Ellman (ácido ditionitrobenzoico, DTNB) el cual reacciona con los grupos sulfhidrilo dando un color amarillo, medible por espectrofotometría. Después de un período de incubación en la oscuridad de 90 minutos se analiza espectrofotométricamente la muestra. Su intensidad será proporcional a la cantidad de trazador de 8-isoprostano unido al pocillo, e inversamente proporcional a la cantidad de 8-isoprostano libre presente en el pocillo. Con las absorbancias de los estándares y sus respectivas concentraciones se trazó una curva de regresión colocando en el eje de ordenadas las concentraciones y en el eje de abscisas las absorbancias. La lectura de la absorbancia se realizó con una longitud de onda de 405 nm en un lector automático de placas de ELISA (Dimension XpandPlus, Siemens Healthcare Diagnostics, Madrid, Spain).

6.2. Determinación de nitritos y nitratos en el plasma sanguíneo y el CAE

Los productos finales *in vivo* del metabolismo del óxido nítrico (NO) son nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). La proporción relativa de estos productos es variable, y por lo tanto no puede predecirse con certeza. Así pues, el mejor índice de la producción de NO es la suma de NO_2^- y NO_3^- . Nosotros medimos el total de ambos, nitritos más nitratos ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$). Se midieron mediante la conversión de NO_3^- a NO_2^- utilizando para ello la acción de la enzima nitrato reductasa. Los reactivos de Griess (sulfanilamida y etilendiamida) se utilizaron para convertir los nitritos (NO_2^-) en un compuesto azo púrpura intenso que se midió con un ensayo colorimétrico a una longitud de onda de 540 nm (Placa de

96 pocillos: Nitrato/nitrito kit de ensayo colorimétrico, Cayman Chemical Co.) siguiendo las indicaciones del fabricante en las muestras de plasma y en las muestras de CAE (Roca et al. 2010). El cálculo de los resultados de las concentraciones de nitritos más nitratos se hizo en base a la curva de calibración los estándares de nitratos.

6.3. Determinación de peróxido de hidrógeno en el CAE

El H_2O_2 es inestable en el CAE, por lo tanto, después de la recolección, se hicieron alícuotas y se congelaron rápidamente a $-80^{\circ}C$, donde permanecieron hasta el momento del análisis (Horváth et al 2005; Lases et al. 2000). Los niveles de H_2O_2 fueron medidos dentro de la primera semana después de la recolección de la muestra. La determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno se hace a través de la oxidación de iones ferrosos a iones férricos por la acción del H_2O_2 en condiciones ácidas utilizando un método colorimétrico (kit de ensayo colorimétrico, Cayman Chemical Co.). Los iones férricos formados se unen al tinte xilenol naranja para formar unos complejos estables, que pueden ser medidos por colorimetría a una longitud de onda de 595 nm.

6.4. Determinación de MDA

La determinación de la concentración de malondialdehído (MDA) en el plasma se hizo a partir de 1 ml de sangre arterial. El MDA es un producto de la peroxidación de los ácidos grasos de las membranas celulares. Pero previamente los peróxidos lipídicos fueron hidrolizados por ebullición en ácido fosfórico diluido. Posteriormente el MDA formado ya puede determinarse, haciéndolo reaccionar previamente con el ácido tiobarbitúrico para formar $MDA(TBA)_2$, el cual puede ser detectado y cuantificado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, high performance liquid chromatography) y detección con luz UV a 532 nm (Wong et al. 1987).

La sangre se recogió en tubos de uso clínico, BD Vacutainer PST II con heparina de litio (BD-Plymouth, UK), tras su centrifugación a 2000 rpm./15 min. El plasma sobrenadante se guardó a -80 °C hasta su análisis. El procedimiento fue el siguiente: A 0.5 ml de tampón AcONa 2 M pH 3,5 + TBA 0.2% se le añadieron 20 µl de plasma. Las muestras se incubaron 60 min a 95 °C, produciéndose la hidrólisis de los líperóxidos, liberándose moléculas de malondialdehído (MDA), las cuales se conjugaron con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico, MDA(TBA₂). A cada muestra se añaden 0.5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 6.8. Se agitan y se centrifugan a 13.000 rpm a 4 °C y el sobrenadante se utiliza para el análisis por HPLC con un detector UV a 532 nm (Shimadzu SPD 10 AV, Shimadzu Scientific Instruments Inc., Columbia,MD, USA). La fase estacionaria utilizada fue una columna Spherisorb C18 de fase reversa de 15 x 0.46 cm con partículas de relleno de 5 µm. Las fases móviles fueron 2: A) KH₂PO₄ 50 mM pH 6.8 / acetonitrilo (en las proporciones 83% / 17%) y B) acetonitrilo / agua (en las proporciones 70 % / 30 %). Para los cálculos, se realizó previamente una curva de calibración con concentraciones conocidas de MDA que se someten al mismo procedimiento de hidrólisis ácida.

6.5. Determinación de glutatión reducido (GSH)

Se empleó el método de Briguelius et al. (1983). Basado en la conjugación del GSH con el cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB). Esta reacción está catalizada por la enzima glutatión-S-transferasa (GST). El adducto formado, 2,4-dinitrofenil-S-glutatión, presenta un máximo de absorción a 340 nm. El cambio de absorbancia medido espectrofotométricamente es proporcional a la cantidad de GSH presente en la muestra. El coeficiente de extinción molar del CDBN es de 9.6 mM⁻¹. cm⁻¹



Para determinar la concentración de glutatión reducido (GSH) en sangre, se tomaron 0.5 ml de sangre total y se le añadieron otros 0.5 ml de ácido tricloroacético al 30%, conteniendo además ácido etilendiaminotetraacético 2mM. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 15000 g/ 5 minutos a 4°C. El sobrenadante ácido fue guardado a -20°C hasta el momento del análisis. La cantidad de GSH fue determinada mediante el uso de un ensayo enzimático con glutatión-S- transferasa (GST). Ensayo basado en la reacción catalizada por la GST entre el clorodinitrobenzeno y el GSH in un tampón fosfato potásico 0.1 M (pH 7), la cual fue espectrofotométricamente detectada con luz visible a 340 nm (Brigelius et al. 1983). En una cubeta se añaden los siguientes reactivos: 825 µl de fosfato potásico 0.1 M + EDTA 1 mM pH 7.0, 25 µl de muestra (sobrenadante ácido) y 10 µl de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno 10 mM en etanol al 100%. Se realiza un autocero (E1) y la reacción comienza añadiendo 10 µl de una solución de GST 500 U7ml en tampón fosfato sódico 0.1 M, EDTA 1 mM pH 7,4. Se registra la variación de absorbancia a 340 nm hasta el final (E2). La diferencia E2-E1 es proporcional a la cantidad de GSH en la muestra.

$$\frac{(E1 - E2) \times \text{vol en la cubeta (ml)}}{9.6 \times \text{vol muestra (ml)}} = \mu\text{moles GSH / ml de muestra ácida}$$

6.6. Determinación de glutatión oxidado (GSSG)

La determinación de la concentración de glutatión oxidado (GSSG) en presencia de un exceso de glutatión reducido (GSH), se hizo a partir de sangre arterial entera (0.5 ml), a la cual se le añadió 0.5 ml de ácido perclórico al 12%, para precipitar las proteínas plasmáticas. Y además, contiene N-etilmaleimida 20 mM (un agente que previene la oxidación del GSH durante la preparación de las muestras), y además un quelante de metales (ácido batho-fenantrolin-disulfónico 1 mM). A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 15000 g/ 5 minutos a 4°C. El sobrenadante ácido fue congelado a -20°C.

Las muestras congeladas, previamente a su análisis, se someten a un proceso de derivatización, donde se les incorpora un patrón interno (γ-glutamylglutamato 1 mM disuelto en ácido perclórico 0.3 %), calibrado previamente respecto a concentraciones conocidas de GSSG. Posteriormente, la cantidad de GSSG en las muestras derivatizadas fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, high performance liquid chromatography) y detección con luz visible (365 nm) (Asensi et al. 1994). Las fases móviles utilizadas como eluyentes fueron: A) metanol al 80 % y B) acetato sódico 0.5 M en metanol al 64 %. Como fase estacionaria se utilizó una columna Spherisorb aminada de 20 x 0.46 cm, con partículas de 5 μm. Para los cálculos, se realizó previamente una curva de calibración con concentraciones conocidas de GSSG que se someten al mismo procedimiento de derivatización (Asensi et al. 1994).

6.7. Determinación del cociente glutatión oxidado/glutatión total

El cociente entre el glutatión oxidado/glutatión total fue calculado como sigue: $[2\text{GSSG}/(\text{GSH}+2\text{GSSG})] \times 100$, y expresado como un porcentaje que nos indicará la cantidad de glutatión que se ha oxidado del total del glutatión en la sangre. Pero este cociente es reflejo del status redox de resto del organismo y es un índice aceptado del estrés oxidativo sistémico (Asensi et al. 1999).

6.8. Determinación de potencial redox (E_h) de GSSG/2GSH

Para calcular el estado redox del par GSSG-GSH, se utilizó la ecuación de Nernst: $E_h = E_0 + RT / nF \ln [\text{disulfuro}] / [\text{tiol}]^2$, donde E_0 es el potencial estándar para el par redox, R es la constante del gas, T es la temperatura absoluta, n es de 2 para el número de electrones transferidos, y F es la constante de Faraday. Para calcular el potencial redox en sangre, se utilizó la ecuación $E_h \text{ (mV)} = E_0 + 30 \log ([\text{GSSG}] / [\text{GSH}]^2)$ a 37 °C (310 K), donde el potencial estándar E_0 es -264 mV a pH 7,4 (-5,9 mV por cada 0,1 de aumento

del pH), E_0 a pH 7,0 es -240, y las concentraciones están en moles / litro (Jones 2002; Schafer & Buettner 2001).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En nuestro estudio previamente referenciado (García-de-la-Asunción et al. 2015) y cuyos datos hemos recogido en esta memoria, los datos son expresados como medias \pm desviación estándar. La normalidad fue evaluada mediante el test de Shapiro-Wilk. Los datos fueron paramétricos y normalmente distribuidos. Un análisis de la varianza de una vía mediante repetidas medidas (*time course*: T1–T4 vs T0) fue realizada para evaluar el efecto del tiempo de la VUP y la posterior reexpansión pulmonar en los niveles de los diferentes marcadores de estrés oxidativo estudiados en el CAE y en el plasma sanguíneo. Cuando las comparaciones fueron significativas, se realizaron comparaciones múltiples *post hoc* con el test de Tukey (o con el test de Games-Howell cuando las varianzas no fueron iguales) entre los diferentes tiempos estudiados. Las correlaciones entre el tiempo total del colapso pulmonar (con VUP) y los niveles de los marcadores de estrés oxidativo (8-iso-PGF_{2 α} , NO₂⁻ +NO₃⁻, H₂O₂), cociente PO₂/FiO₂ y pH en el CAE y en el plasma sanguíneo se evaluaron con el coeficiente de Pearson (r). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando los valores de P fueron <0.05. El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS, versión 16.0 (SPSS, Inc.m Chicago, IL, USA).

Así mismo, en nuestro otro estudio previamente referenciado (García-de-la-Asunción et al. 2016) y cuyos datos también han servido como base de esta memoria. Los datos son expresados como medias \pm desviación estándar. La normalidad se evaluó por el test de Shapiro-Wilk. Los datos fueron paramétricos y normalmente distribuidos. Se realizó un análisis de la varianza de una vía mediante repetidas medidas (*time course*: T1–T4 vs T0) para evaluar el efecto del tiempo del colapso pulmonar (y VUP) y la posterior reexpansión pulmonar en los niveles de los diferentes marcadores de la oxidación del glutatión y de la peroxidación lipídica en sangre. Y en consecuencia, cuando los valores de F fueron significativos, se realizaron

comparaciones usando la T de Student, con $P < 0.05$ como valor límite de significación. Las correlaciones entre el tiempo total del colapso pulmonar durante la VUP y los niveles de los marcadores de estrés oxidativo (GSH, GSSG, MDA, etc), potencial redox y el cociente PO_2/FiO_2 en sangre se evaluaron con el coeficiente de Pearson (r). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando los valores de P fueron < 0.05 . El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS, versión 11.0 (SPSS, Inc.m Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

V. RESULTADOS

Como ya dijimos en el apartado Metodología, esta tesis doctoral se ha realizado a partir de los resultados obtenidos en dos estudios previos, unicéntricos, prospectivos y observacionales. Cuyos resultados describen el estrés oxidativo producido por la lobectomía pulmonar publicados recientemente (García-de-la-Asunción et al. 2015; García-de-la-Asunción et al. 2016). Estos dos estudios, aunque independientes, estudian ambos el mismo fenómeno de isquemia-reperfusión y sus consecuencias pero desde objetivos diferentes. Entre los dos estudios se han reunido un total de 60 pacientes: 28 pacientes en un estudio, donde se miden marcadores de estrés oxidativo como el 8-isoprostano en el CAE y en plasma sanguíneo (García-de-la-Asunción et al. 2015). Mientras que el otro trabajo estudió a 32 pacientes, pero con el objetivo principal puesto en la oxidación del glutatión en sangre (García-de-la-Asunción et al. 2016).

1. Descripción de los resultados correspondientes al estudio: García-de-la-Asunción J, et al. Oxidative lung injury correlates with one-lung ventilation time during pulmonary lobectomy: a study of exhaled breath condensate and blood. *Eur J Cardiothorac Surg* 2015; doi:10.1093/ejcts/ezv207.

Los parámetros funcionales, demográficos, preoperatorios y los datos del período intraoperatorio se han resumido en la Tabla I.

Tabla I. Datos demográficos y clínicos de los pacientes.

Edad (años)	64.5 ± 10.2
Sexo (H/M)	24/4
IMC (kg/m ²)	26.2 ± 4.1
Fumadores (n)	9
Ex-fumadores (n)	17
Nunca fumadores	2
Preoperatorio FEV ₁ (L)	2.07 ± 0.58
Preoperatorio FVC (L)	2.75 ± 0.69
Preoperatorio FEV ₁ /FVC	0.77 ± 0.23
Lado del tumor (D/I)	17 / 11
Localización	
LSD	14
LM	1
LID	2
LSI	9
LII	2
Histología	
Adenocarcinoma	10
Carcinoma escamoso	17
Otros	1
Tiempo de VUP (min)	113 ± 39
Duración de la cirugía (min)	152 ± 37
Líquido intraoperatorio (L)	1.40 ± 0.33
Orina intraperatoria (L)	0.55 ± 0.32

Valores expresados como media \pm SD. IMC: índice de masa corporal; FEV₁: forced expiratory volume in one second; FVC: forced vital capacity; VUP: ventilación unipulmonar; LSD: lóbulo superior derecho; LMD: lóbulo medio derecho; LID: Lóbulo inferior derecho; LSI: lóbulo superior izquierdo; LII: lóbulo inferior izquierdo.

La Tabla II resume los parámetros de las gasometrías arteriales de todos los pacientes en varios puntos de tiempo durante la lobectomía. Los valores de PaCO₂ fueron significativamente mayores (P<0.05) en el punto T1 durante la VUP que en T0 (valores basales). En relación con T0, los valores de PaO₂ disminuyeron en los tiempos T1, T3 y T4, particularmente en el tiempo T1 (durante la VUP; P <0,001), y se mantuvieron bajos en T3 y T4 (P<0,05). Igualmente, los valores del cociente PaO₂ / FiO₂ fue significativamente menores en el tiempo T1 (P<0,001) que en tiempo T0.

Tabla II. *Time course* de los gases arteriales durante las lobectomías.

	T0	T1	T2	T3	T4
pH	7.37 \pm 0.04	7.36 \pm 0.03	7.35 \pm 0.04	7.37 \pm 0.03	7.37 \pm 0.04
PaCO₂	36.4 \pm 3.4	39.0 \pm 2.4*	37.9 \pm 2.8	37.4 \pm 1.3	37.0 \pm 3.4
PaO₂	170 \pm 31	136 \pm 31***	151 \pm 33	146 \pm 32*	147 \pm 26*
PaO₂/FiO₂	329 \pm 70	245 \pm 80***	284 \pm 74	293 \pm 65	295 \pm 52

Valores expresados como media \pm desviación estándar; n=28; PaO₂ (mmHg): presión parcial de oxígeno; PaCO₂ (mmHg): presión parcial de dióxido de carbono. Diferencias estadísticas realizadas con un *post hoc* análisis de la varianza, T1-T4 vs.T0: *(P<0,05), **(P<0,01), ***(P< 0.001).

Los valores medios durante la cirugía fueron los siguientes: temperatura, $35.9 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; presión arterial 82 ± 6 mmHg; frecuencia cardíaca, 80 ± 19 latidos/min. Ningún paciente tuvo dificultad para mantener el aislamiento pulmonar durante la operación. No fue necesario implementar medidas intermitentes con VBP por descenso de la saturación de O_2 durante el VUP. Sólo en 6 pacientes de 28 (21,4%) necesitaron intermitentemente más del 50% de oxígeno durante la VUP. Todos los pacientes fueron extubados sin incidentes. No se produjeron fallos en la analgesia epidural de ningún paciente.

Después de las primeras 24 horas de ingreso en la Unidad de Reanimación. La temperatura media de los pacientes fue de $37,36 \pm 0,33$ °C, asociada a un promedio de 9750 ± 3700 leucocitos/ml. En el análisis de los gases arteriales, encontramos que en 4 pacientes de los 28 (14%) el cociente $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ fue <200 , mientras que el valor promedio de todos los pacientes fue de 254 ± 56 . Durante las primeras 24 horas de estancia en la Unidad de Reanimación, la radiografía de tórax de 5 de los pacientes del total de 28 (18%) mostraron diferentes grados de infiltrado pulmonar, pero solo en el lado del pulmón operado. También se observaron arritmias cardíacas (fibrilación auricular) en 7 pacientes de los 28 (25%) en algún momento de su estancia en la Unidad. Ningún paciente desarrolló sepsis o murió durante su estancia en el hospital, ni en la Unidad de Reanimación.

El curso temporal de los niveles de los marcadores de estrés oxidativo y pH en el CAE y en muestras de sangre arterial aparecen en la Figura 16 (A-F). En el CAE, los niveles de 8-isoprostano (8-iso-PGF $_{2\alpha}$), un producto final estable de la oxidación de los fosfolípidos celulares, aumentaron desde T1 a T4 en comparación con T0, particularmente en los tiempos T2 durante el colapso pulmonar y en T3, después de la reexpansión pulmonar ($P < 0,001$) (Fig. 16A).

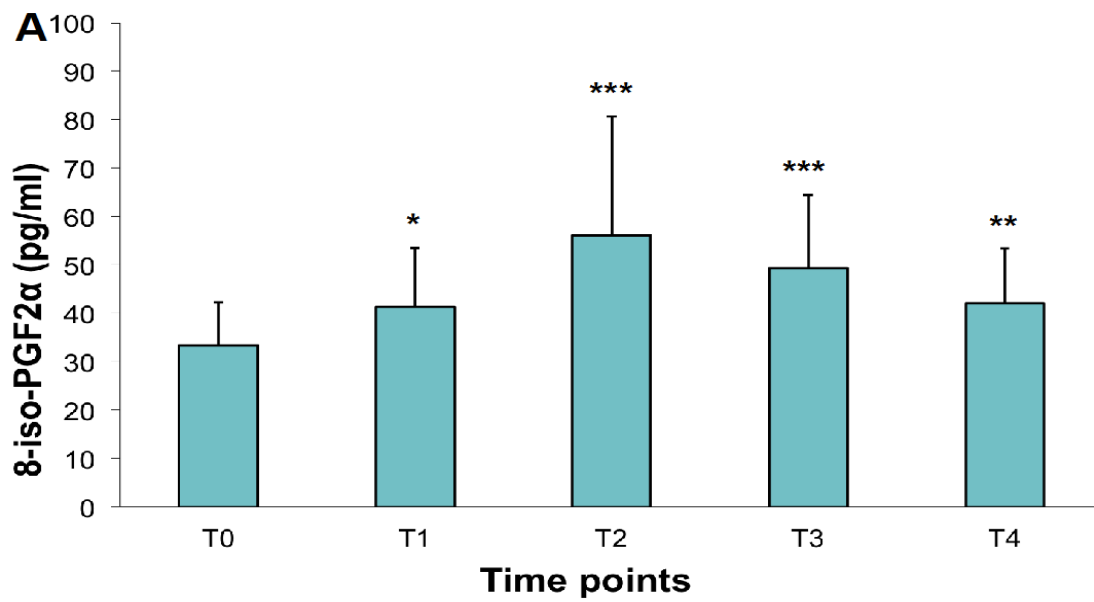


Figura 16A. *Time course* de las concentraciones de 8-isoprostano en el CAE:

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Los niveles de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ en el CAE también aumentaron significativamente en T1 y T2 con respecto a T0 (P <0,05 y P <0,001, respectivamente) (Fig. 16B).

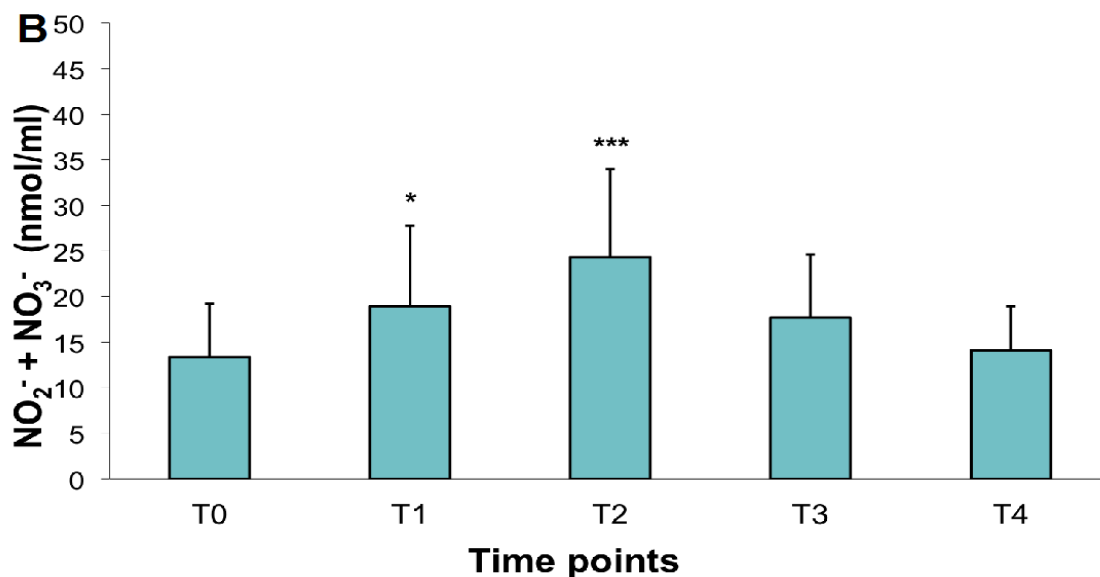


Figura 16B. *Time course* de las concentraciones de NO₂⁻ + NO₃⁻ en el CAE:
*P<0.05; ***P<0.001.

Se observaron aumentos significativos en los niveles de H₂O₂ del CAE en T2 en comparación con T0 (P <0,05) (Fig. 16C). Se detectó una correlación significativa e inversa (R = -0.3926; P = 0.0470) entre los valores de FEV₁ preoperatorios y H₂O₂ en el CAE en el tiempo basal T0.

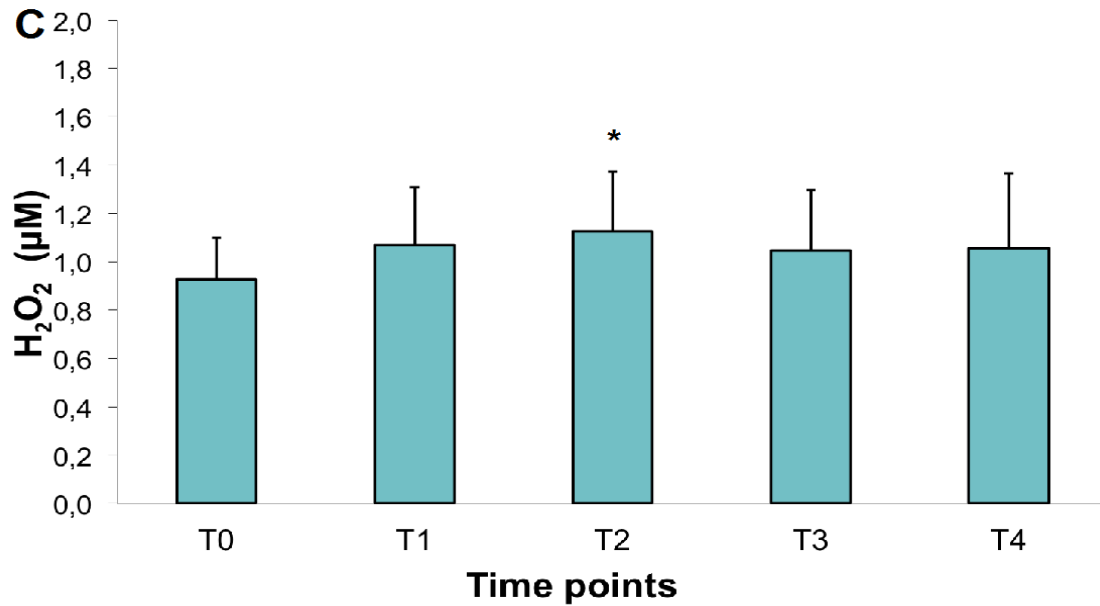


Figura 16C. *Time course* de las concentraciones de H₂O₂ en el CAE: *P<0.05.

El pH en el CAE disminuyó significativamente en T2 (P<0,05) (Fig. 16D).

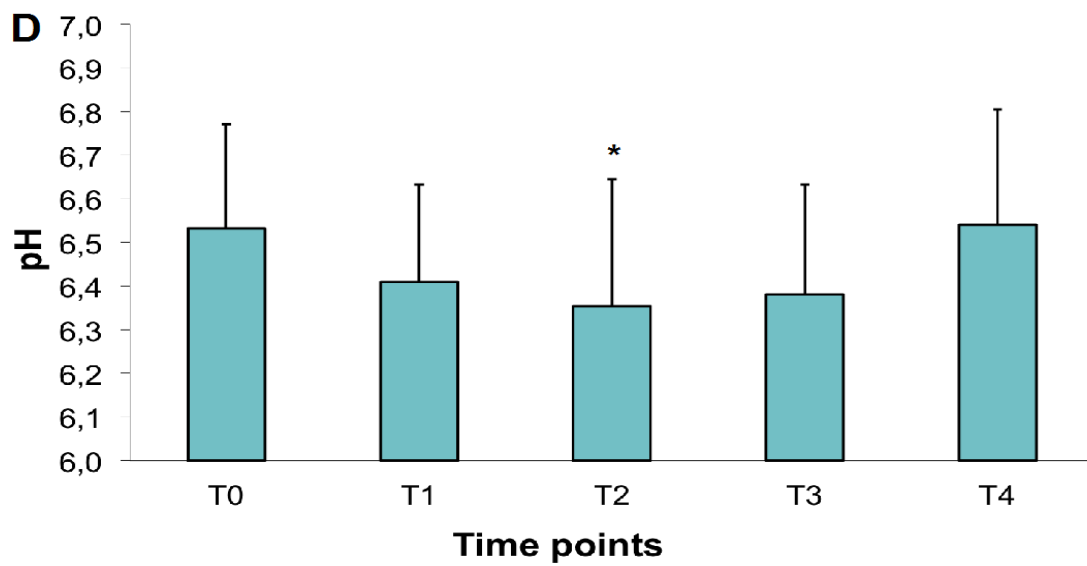


Figura 16D. *Time course* de los valores del pH en el CAE: *P<0.05.

Los niveles de 8-isoprostano en el plasma sanguíneo procedente de la sangre arterial fueron significativamente superior en T1-T3 en comparación con T0 ($P < 0,05$, $P < 0,001$ y $P < 0,01$, respectivamente); sin embargo, estos niveles eran aproximadamente la mitad que los valores detectados en las muestras de CAE (Fig. 16E).

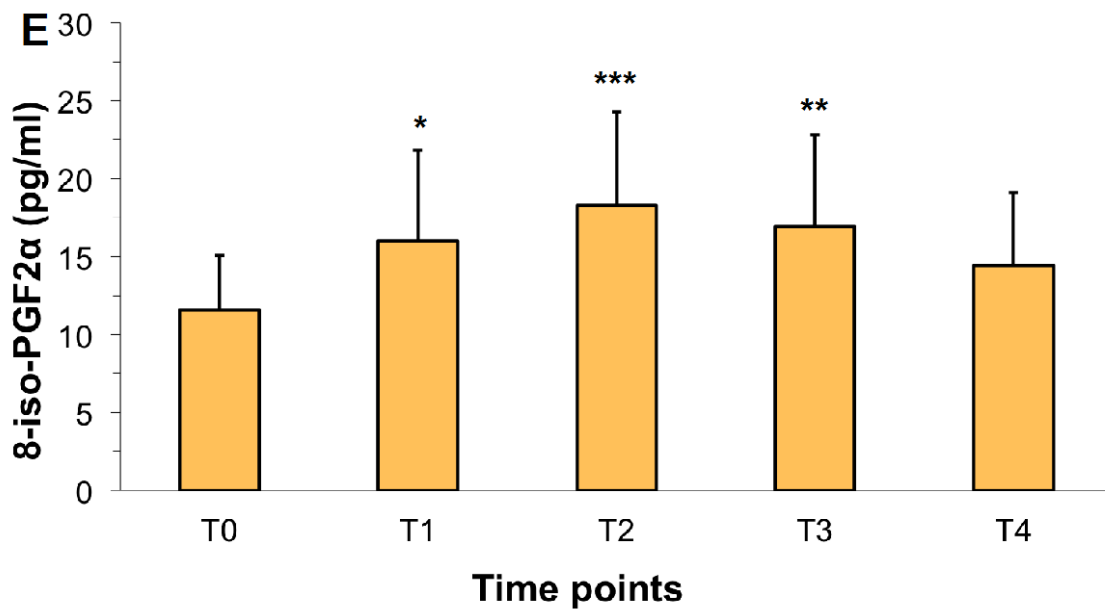


Figura 16E. *Time course* de las concentraciones de 8-isoprostano en el plasma sanguíneo: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Las concentraciones en el plasma sanguíneo de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ fueron significativamente mayores en el tiempo T2 que en T0 ($P < 0.01$), pero en el plasma estas concentraciones fueron aproximadamente el doble que las encontradas en el CAE (Fig. 16F).

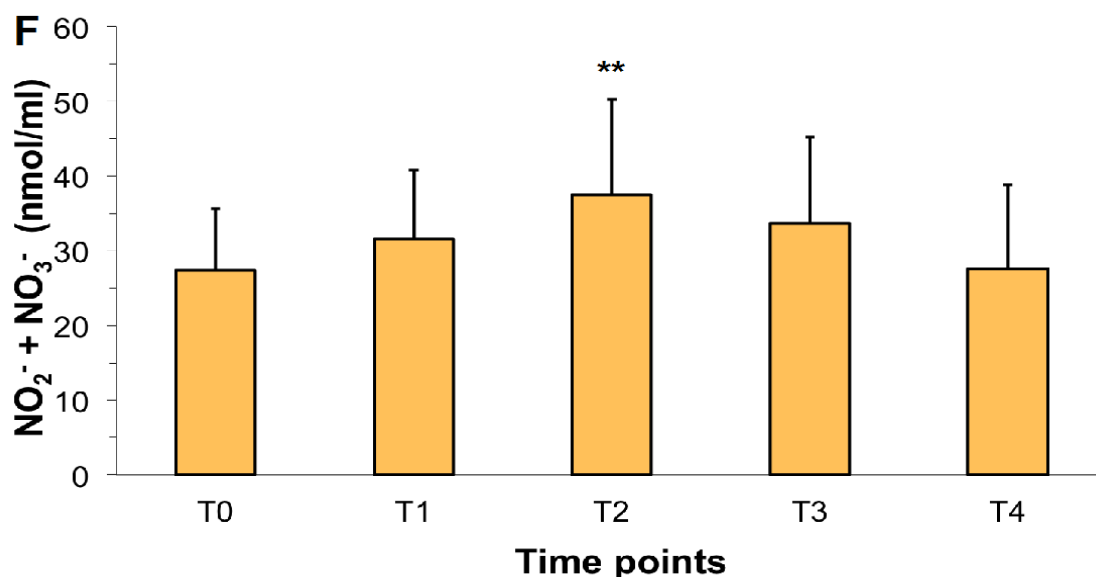
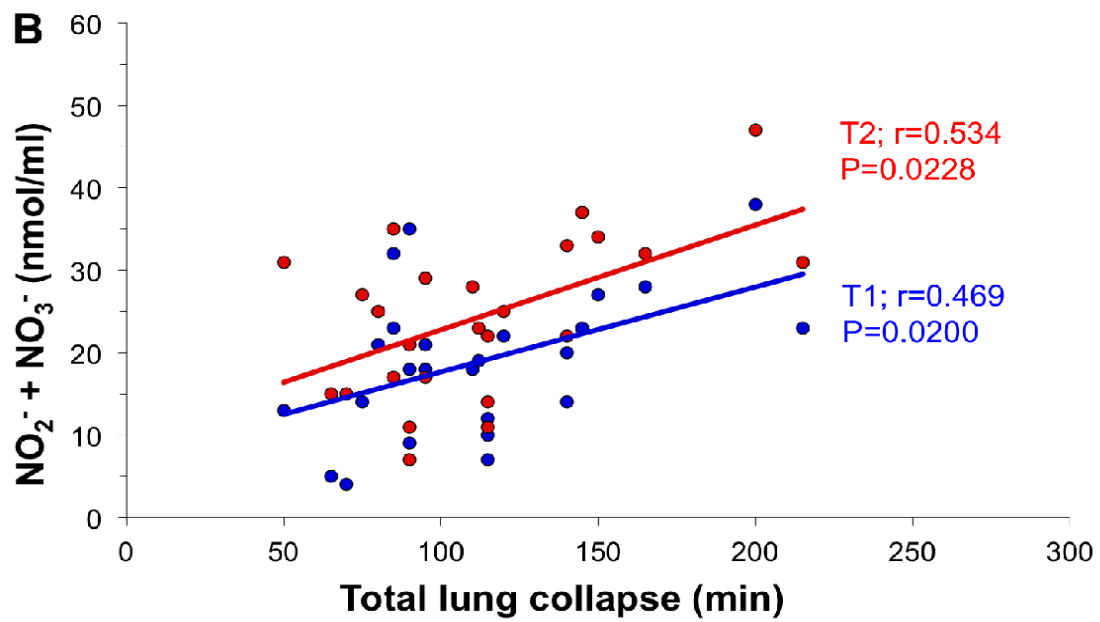
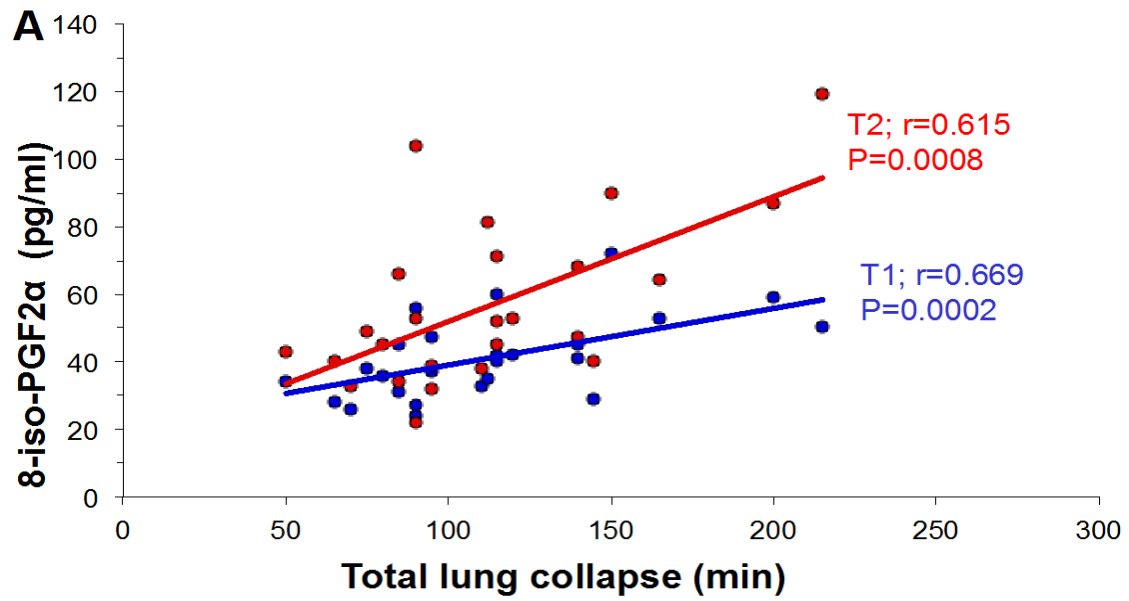


Figura 16F. *Time course* de las concentraciones de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ en el plasma sanguíneo: ** $P < 0.01$.

Los niveles de todos los marcadores medidos de estrés oxidativo en el CAE se correlacionaron positivamente con la duración del colapso pulmonar durante la lobectomía en tiempo T1, e igualmente también después de la re-expansión pulmonar en T2 (8-isoprostano, $P < 0,001$; $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, $P < 0,05$; H_2O_2 , $P < 0,01$) (Fig. 17 A-C). Asociados a una disminución significativa en el pH del CAE en T2 (Fig. 16D) que se correlacionó inversamente con la duración del colapso pulmonar en T1 y T2 ($P < 0,05$, Fig. 17D).



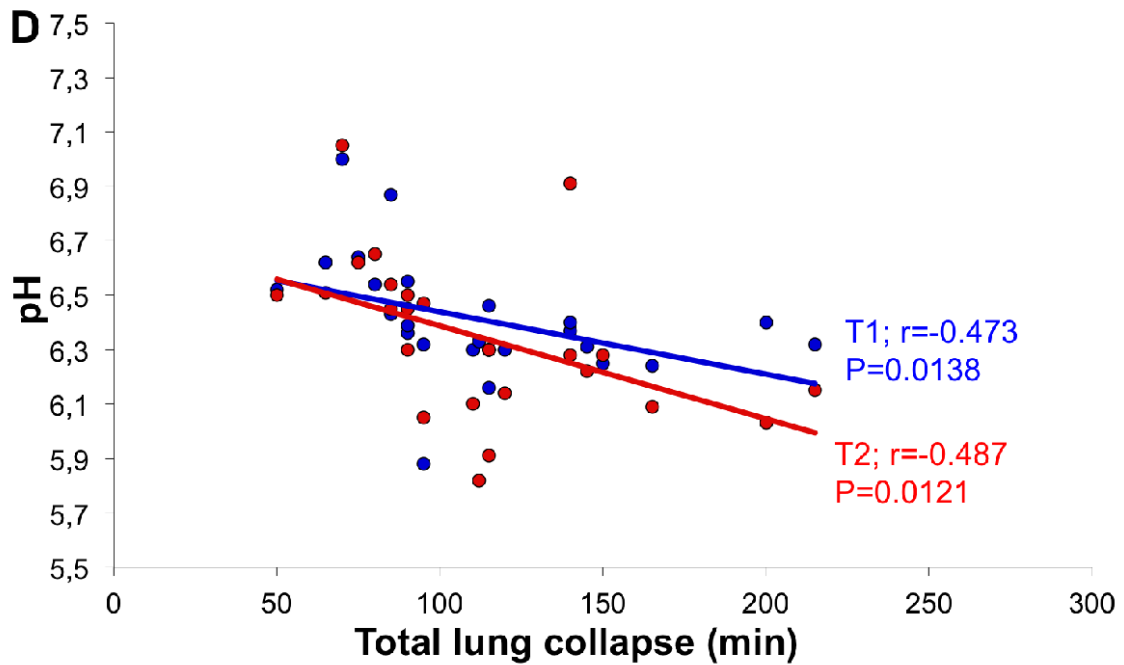
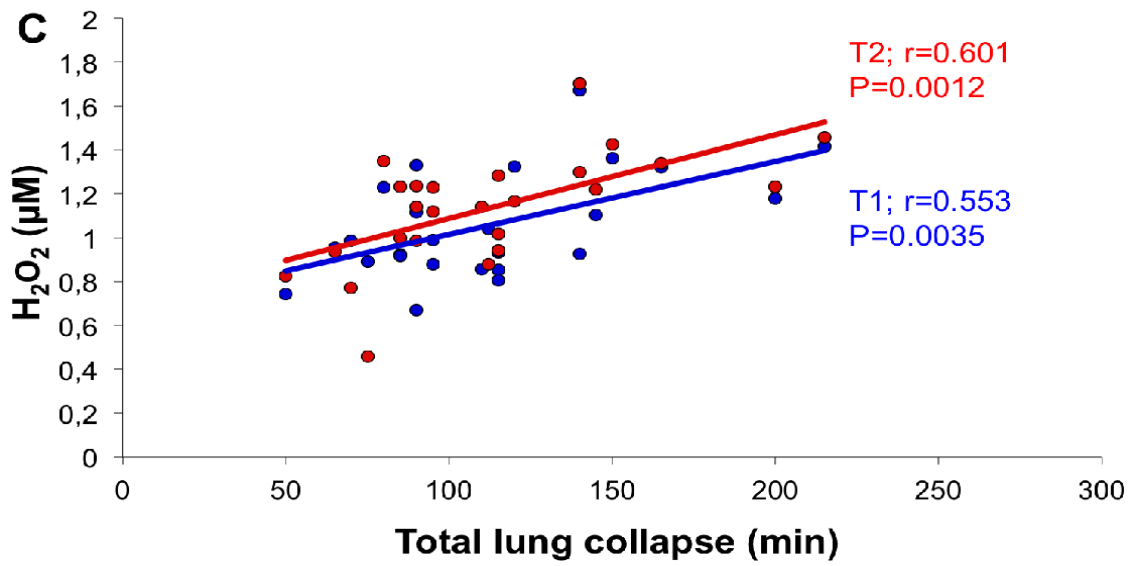
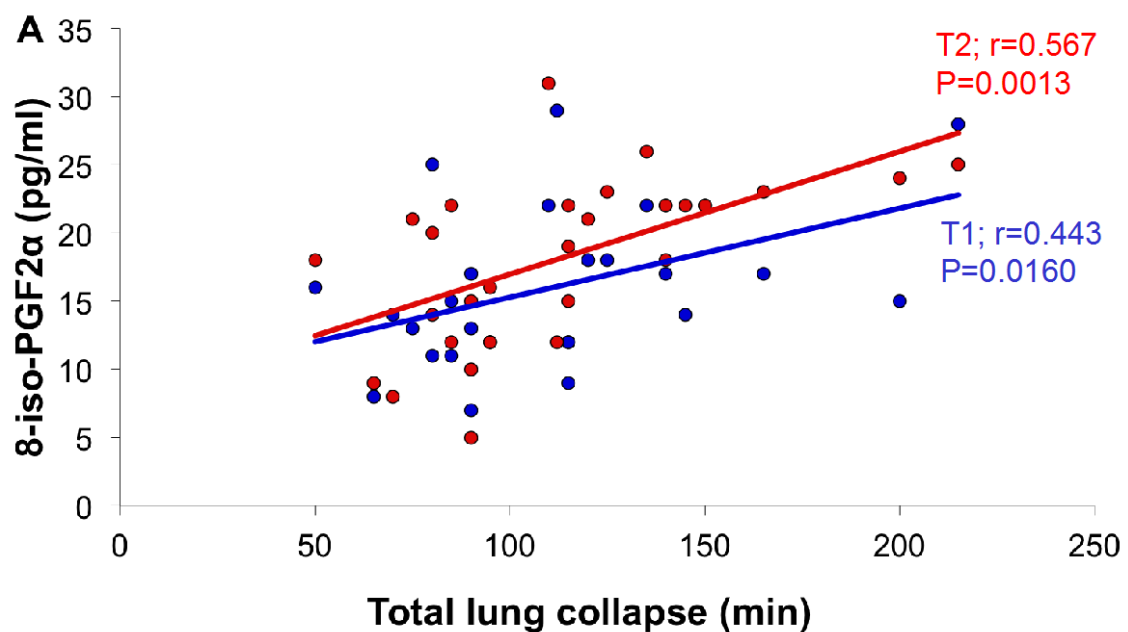
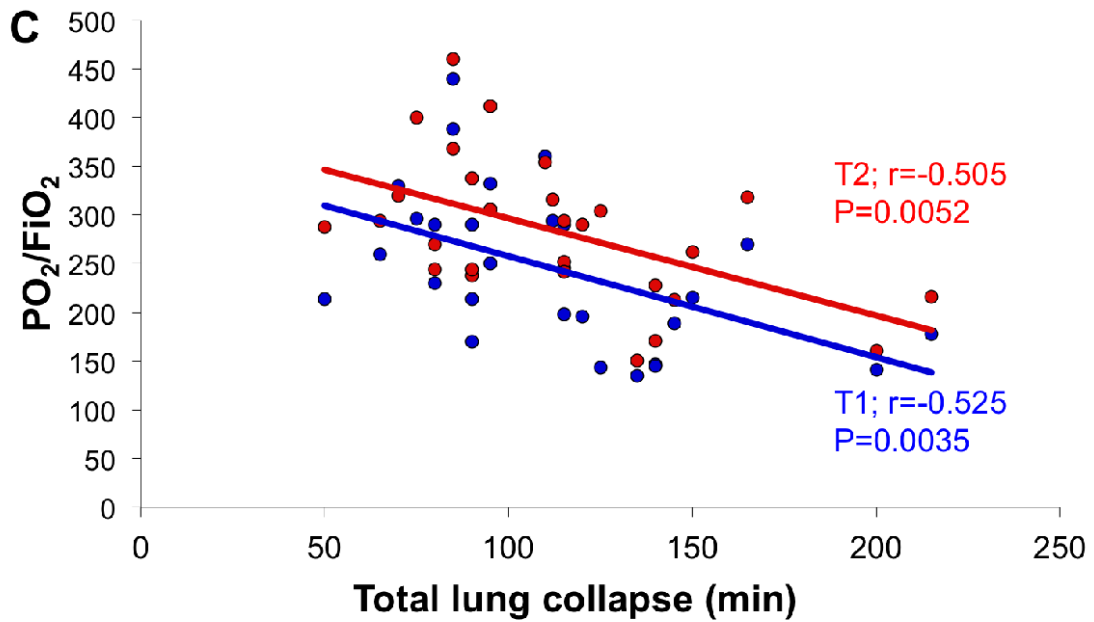
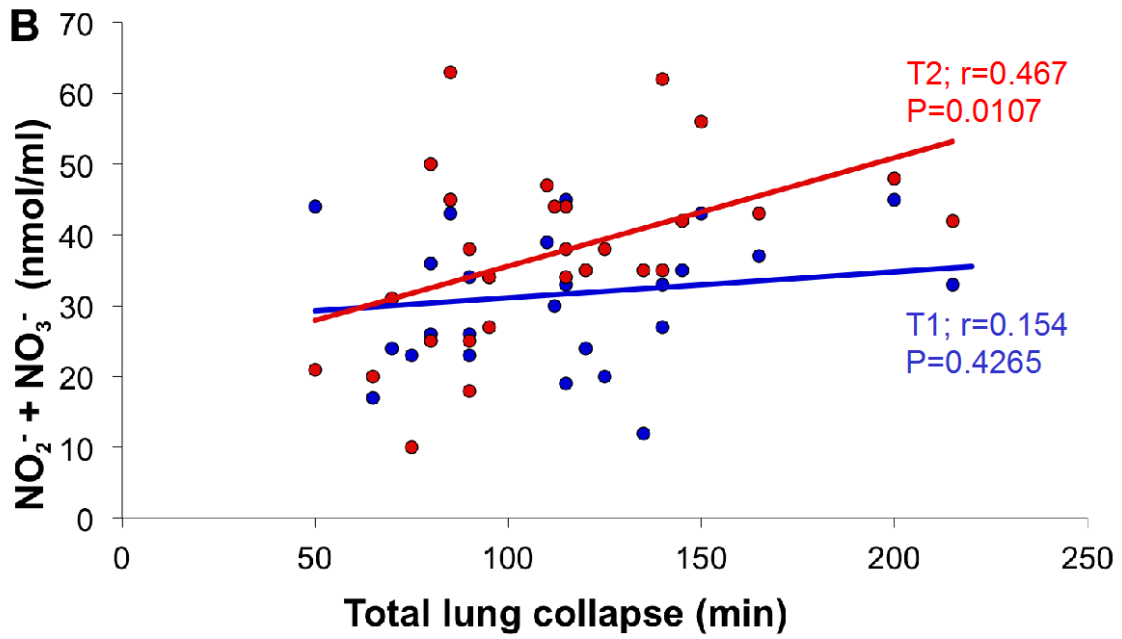


Figura 17. Coeficientes de correlación de Pearson (r) del tiempo de colapso pulmonar y los valores de los diferentes marcadores en el CAE (A, B, C y D).

En la sangre arterial, los niveles plasmáticos de 8-isoprostano y la duración de la VUP por el colapso pulmonar del pulmón operado se correlacionaron directamente en T1 ($r = 0.443$; $P < 0.05$) y esta correlación fue más fuerte en T2 ($r = 0.567$; $P < 0.01$) después de la reexpansión pulmonar (Fig. 18A). Las concentraciones plasmáticas de los nitritos y nitratos ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) también se correlacionaron con el tiempo de VUP de forma significativa ($r = 0.467$; $P < 0.05$) pero solamente en T2 (Fig. 18B). En la sangre arterial, los valores del cociente $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ y los valores del pH se correlacionaron inversamente con la duración del colapso pulmonar durante la lobectomía en T1 y T2: en el cociente $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ en T1 ($r = -0.525$, $P < 0.01$) y T2 ($r = -0.505$, $P < 0.01$); y en el valor del pH en T1 ($r = -0.369$, $P < 0.05$) y en T2 ($r = -0.452$, $P < 0.05$). Siendo esta la primera vez que se describen estas correlaciones inversas observadas por nosotros (Fig. 18C y Fig. 18D).





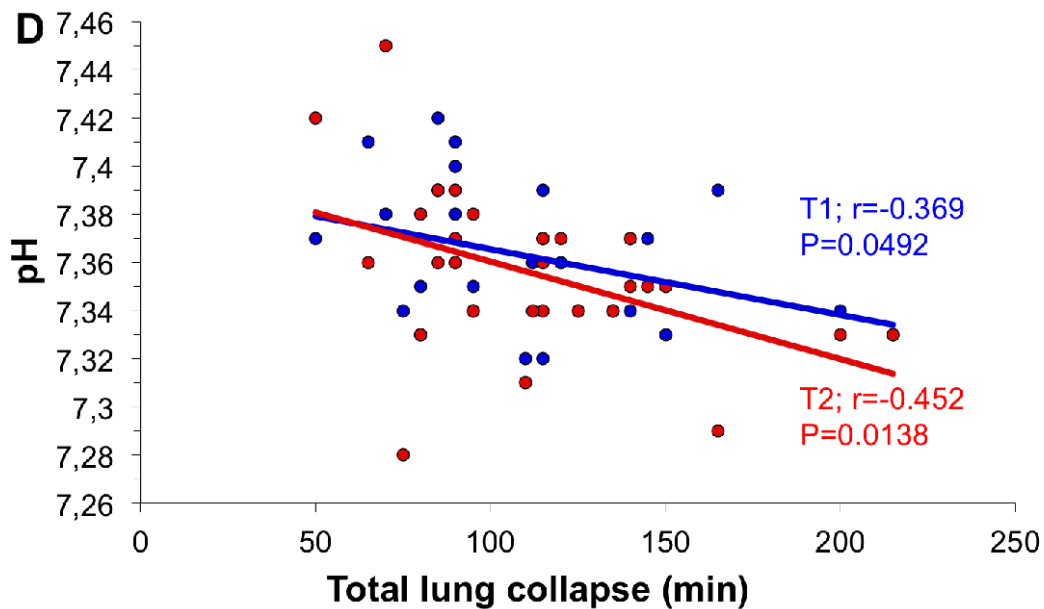


Figura 18. Coeficientes de correlación de Pearson (r) del tiempo de colapso pulmonar y los valores de algunos marcadores en sangre arterial (A, B, C y D).

Se detectó una correlación positiva entre los niveles de H_2O_2 (un potente pro-oxidante formado por la dismutación del radical superóxido) y los niveles de 8-isoprostano (que reflejan la peroxidación lipídica y el daño oxidativo pulmonar) en el CAE en T1 (durante el colapso pulmonar) ($r = 0,389$, $P < 0,05$), pero no durante la reexpansión pulmonar en T2 (Figura 19A). Los niveles de $NO_2^- + NO_3^-$ (productos finales del metabolismo del NO y del anión peroxinitrito) en el CAE fueron aún más fuertemente correlacionados ($r = 0,528$; $P < 0,01$) con los niveles de H_2O_2 en T1 (Figura 19B). Sin embargo, Los niveles de H_2O_2 (Fig. 19C) y 8-isoprostano (Fig. 19D) en el CAE fueron significativa e inversamente correlacionados con el cociente PaO_2/FiO_2 en sangre arterial en T2. Estas correlaciones fueron particularmente fuertes con los niveles de H_2O_2 ($r = -0,531$; $P < 0,01$), lo que sugiere una perturbación en el transporte de oxígeno inducido por daño oxidativo a la membranas alveolares

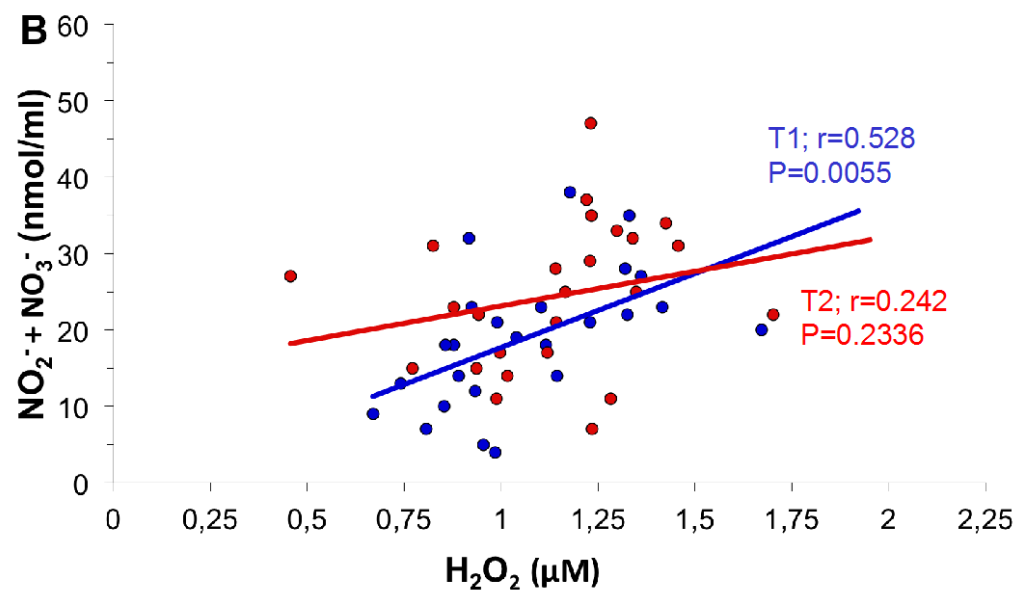
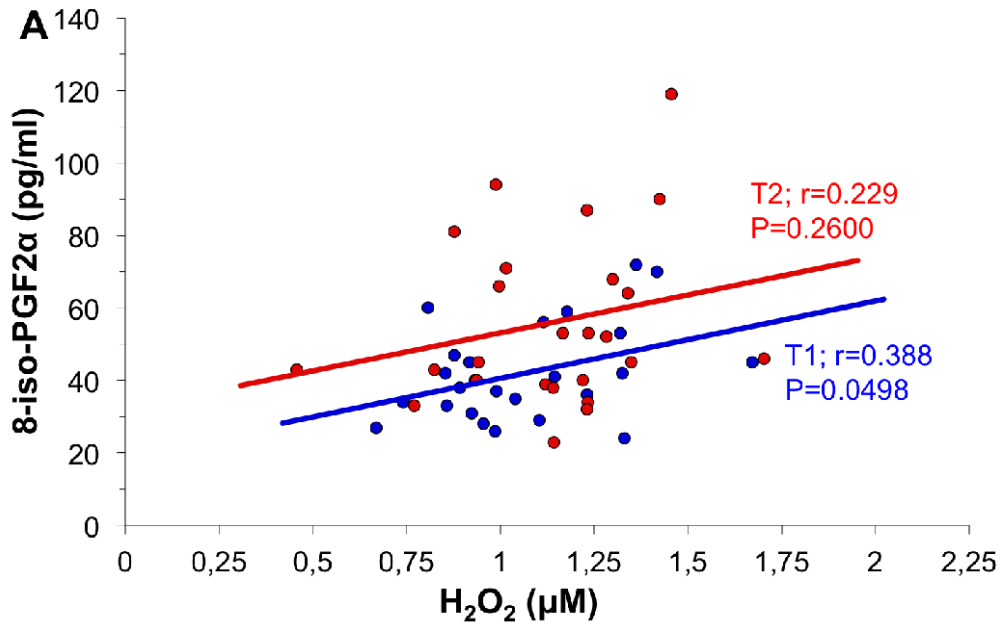


Figura 19. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre concentraciones de H₂O₂ y marcadores de daño oxidativo en CAE (A y B)

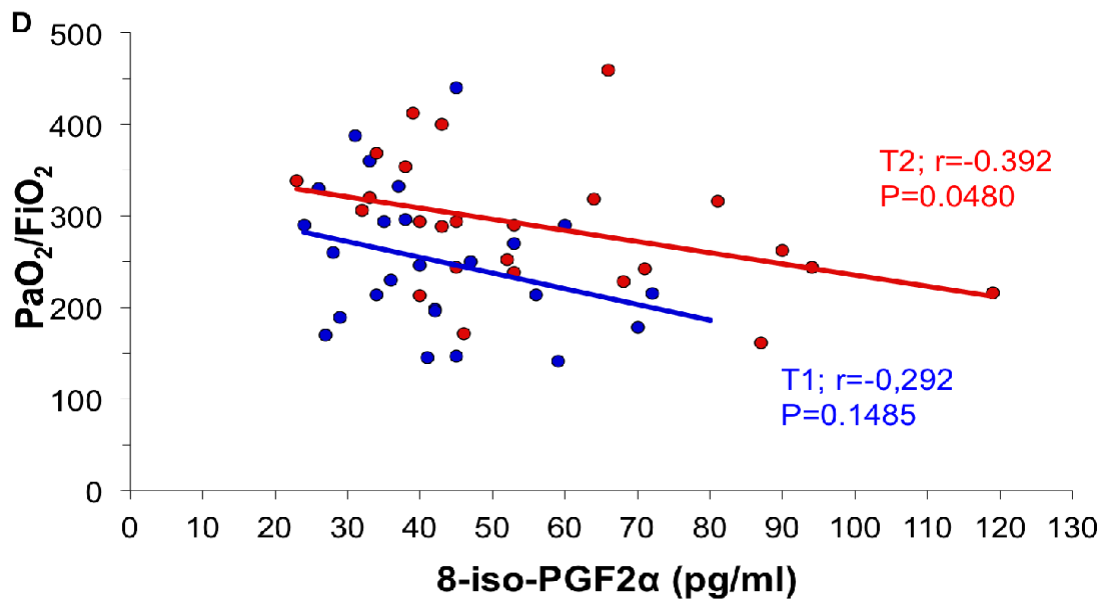
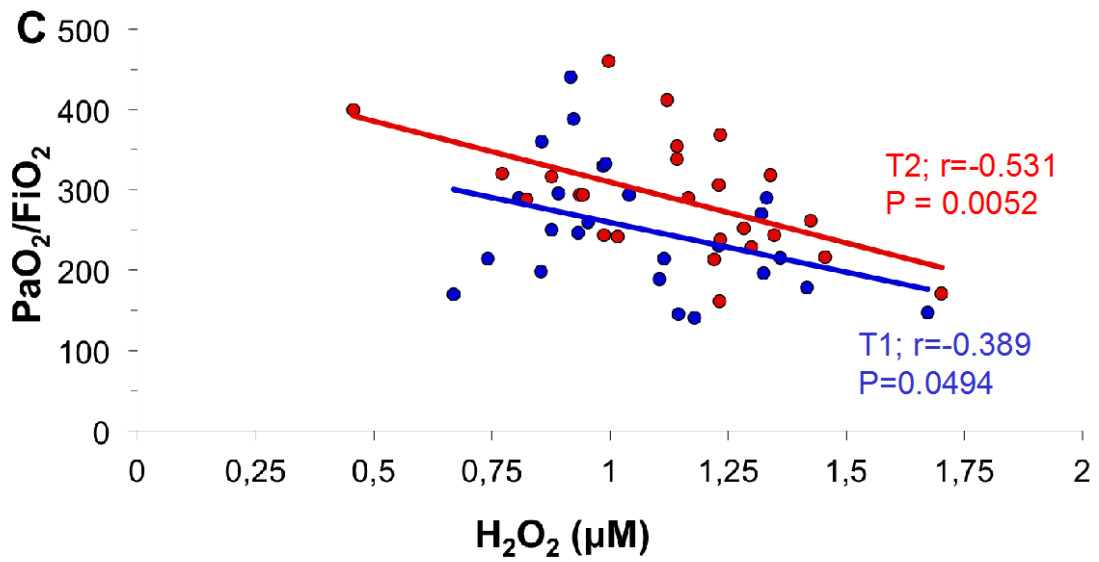


Figura 19. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre marcadores de daño oxidativo en el CAE y con el cociente $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (C y D).

2. Descripción de los resultados correspondientes al estudio: José García-de-la-Asunción, et al. Glutathione oxidation correlates with one-lung ventilation time and PO₂/FiO₂ ratio during pulmonary lobectomy. *Redox Report* 2016; 21: 219-226.

La Tabla III resume los principales parámetros preoperatorios y los datos clínicos durante la cirugía.

Tabla III. Datos demográficos, preoperatorios e intraoperatorios.

Edad (años)	65.6 ± 10.0
Sexo (H/M)	27/5
IMC (kg/m ²)	25.8 ± 4.3
Fumadores (n)	10
Ex-fumadores (n)	19
Nunca fumadores	3
FEV ₁ (L)	2.05 ± 0.53
Lado (derecho/izquierdo)	20 / 12
Histología	
Adenocarcinoma	13
Carcinoma escamoso	18
Otros	1
Tiempo de VUP (min)	111 ± 38
Tiempo de cirugía (min)	150 ± 37
Líquidos intraoperatorios (l)	1.28 ± 0.30
Orina intraoperatoria (l)	0.60 ± 0.38
Presión arterial media (mmHg)	78 ± 9
Frecuencia cardiaca (latidos/min)	84 ± 16
Temperatura (°C)	35.7 ± 0.6

Valores expresados como media \pm desviación estándar (n=32). IMC: índice de masa corporal; FEV₁: *forced expiratory volume in one second*; VUP: ventilación unipulmonar.

Siete pacientes necesitaron intermitentemente oxígeno a mayor FiO₂ (>50%) durante la VUP para mantener la saturación de O₂ >92%. Con ningún paciente se tuvo dificultades para mantener el aislamiento pulmonar y la VUP durante la cirugía. En cinco pacientes, la relación PaO₂/FiO₂ en la gasometría arterial fue <200 dentro de las primeras 24 horas de admisión en la Unidad de Reanimación, siendo la media para todos los pacientes de 250 \pm 54).

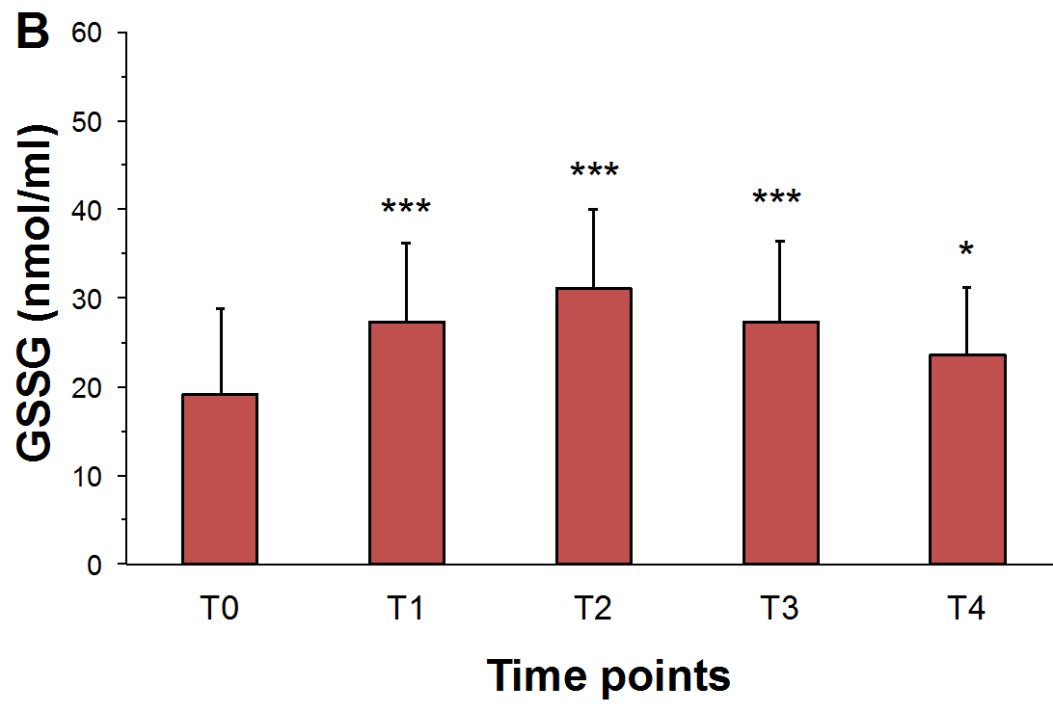
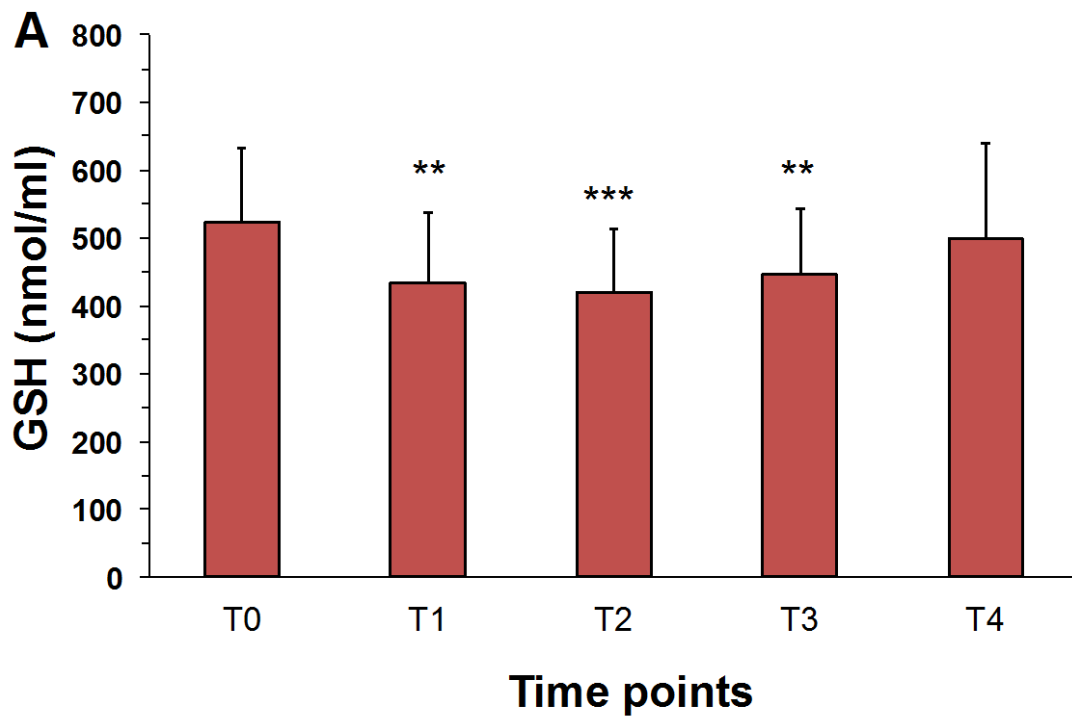
En la Tabla IV se describen los parámetros gasométricos arteriales de todos los pacientes. Comparando los valores en los tiempos T1-T4 con T0. Estos resultados demostraron una disminución significativa del pH en T2, 5 minutos después de reanudar la ventilación bipulmonar (VBP) (P =0,041). En el tiempo T1(durante la VUP), 5 minutos antes de reanudar la VBP, se observó un aumento significativo en PaCO₂ (P <0,001). Los valores de PaO₂ disminuyeron en todos los tiempos: T1 (P <0,001), T2 (P <0,01), T3 (P <0,01) y T4 (P <0,001). Así mismo, el valor del cociente PaO₂/FiO₂ también disminuyó en T1 (P <0,001), T2 (P <0,01), T3 (P <0,05) y T4 (P <0,01).

Tabla IV. Gasometrías arteriales durante las lobectomías pulmonares.

	T0	T1	T2	T3	T4
pH	7.37 \pm 0.034	7.359 \pm 0.026	7.356 \pm 0.033*	7.373 \pm 0.027	7.368 \pm 0.042
PaCO₂	36.5 \pm 3.2	39.2 \pm 2.3***	37.7 \pm 2.8	37.3 \pm 1.6	36.9 \pm 3.3
PaO₂	171 \pm 30	134 \pm 30***	147 \pm 33**	145 \pm 31**	146 \pm 25***
PaO₂/FiO₂	333 \pm 68	243 \pm 76***	278 \pm 71**	290 \pm 62*	291 \pm 50**

Valores expresados como media \pm desviación estándar (n=32). PaO₂ (mmHg): presión parcial de oxígeno; PaCO₂ (mmHg): presión parcial de dióxido de carbono; FiO₂: fracción de oxígeno inspirado. Diferencias estadísticas, T0 vs. T1-T4: *P<0.05, **P<0.01, ***p< 0.001.

En la Figura 20 se resumen los valores del *time course* en los niveles de los marcadores de estrés oxidativo en la sangre arterial desde T0 a T4. Donde el principal antioxidante celular GSH disminuyó significativamente durante los tiempos T1 (P <0,01), T2 (P <0,001) y T3 (P <0,01) (Figura 20A). A diferencia de lo ocurrido con los niveles de GSSG en sangre, que aumentaron significativamente en T1 (P <0,001), T2 (P <0,001), T3 (P <0,001) y T4 (P <0,01) (Fig. 20B), con un aumento particular en T2 debido a una fuerte oxidación de GSH durante la reexpansión pulmonar. El cociente glutatión oxidado en sangre/glutatión total también aumentó en T1 (P <0,001), T2 (P <0,001) y T3 (P <0,001) (Figura 20C), que representa el estado redox sistémico. El malondialdehído (MDA), un producto final de la peroxidación de los fosfolípidos celulares, también aumentó significativamente sus niveles en T1 (P <0,01), T2 (P <0,001), T3 (P <0,01) y T4 (P <0,05), aunque más intensamente en T2 debido a la reexpansión pulmonar (Fig. 20D).



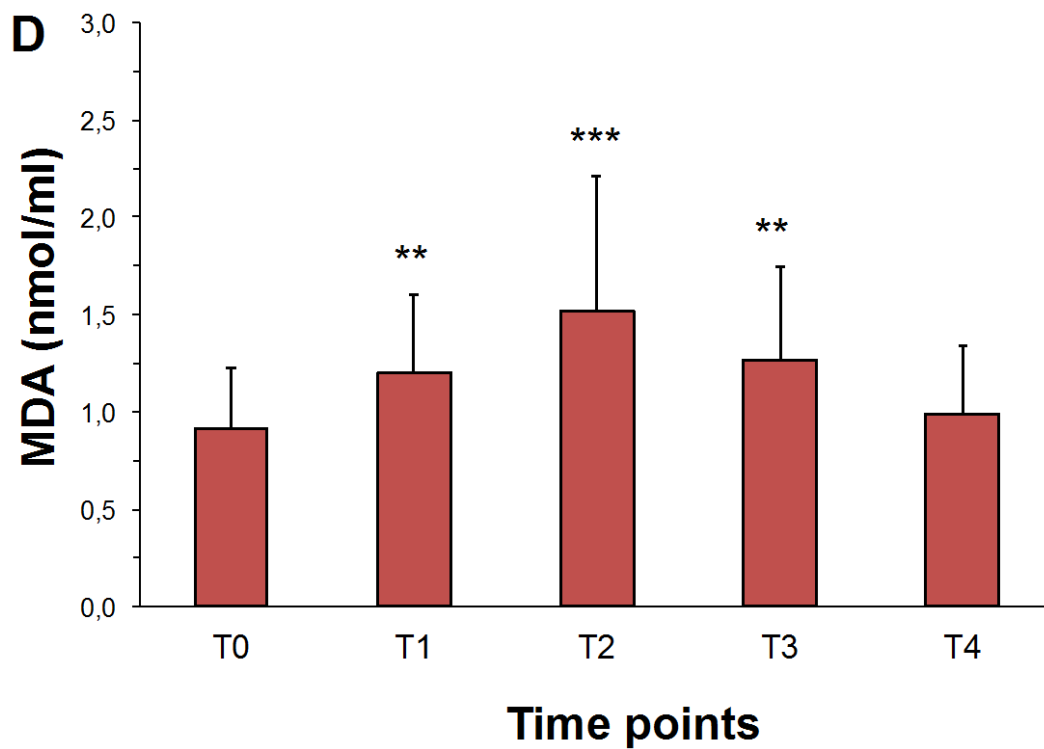
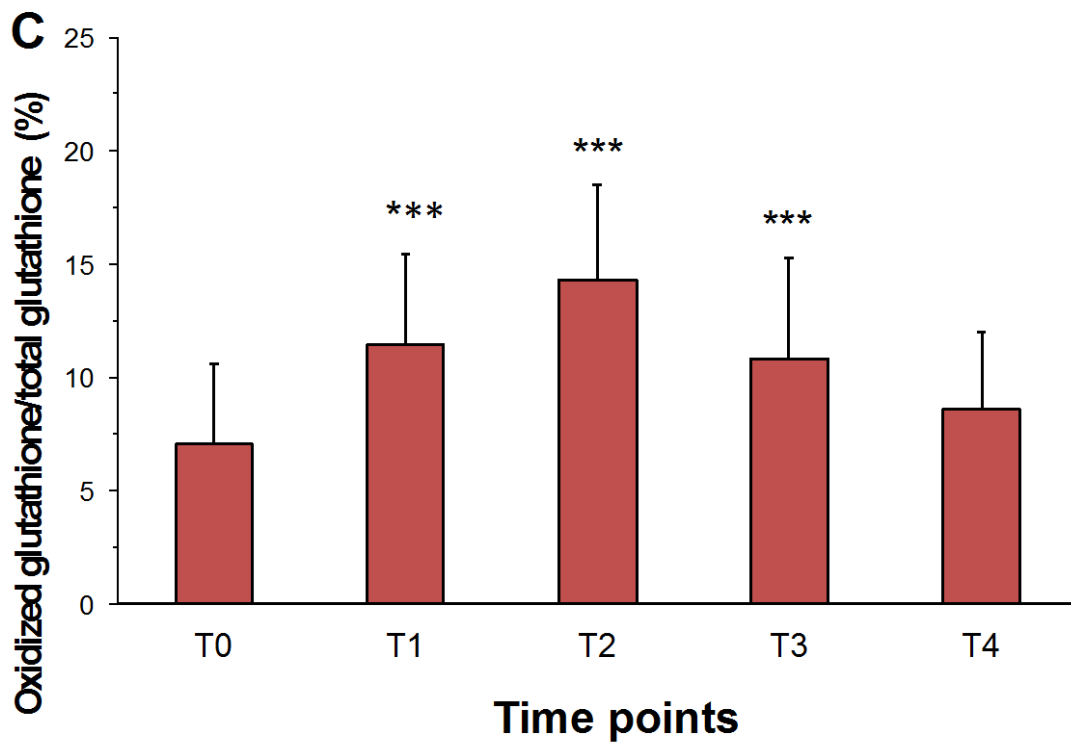


Figura 20. *Time course* de los niveles de marcadores de la oxidación del glutatión (GSH, GSSG, $[2\text{GSSG}/(\text{GSH} + 2\text{GSSG})] \times 100$) (Fig. 20A-C) y de la

peroxidación lipídica (MDA)(Fig. 20D) en sangre arterial. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

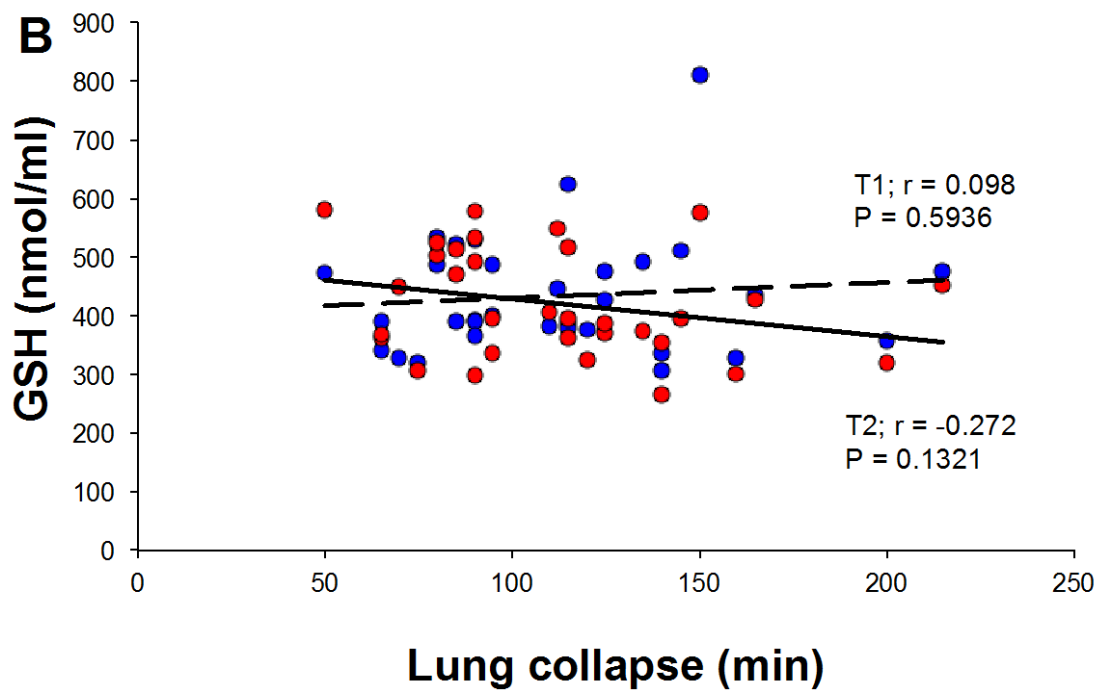
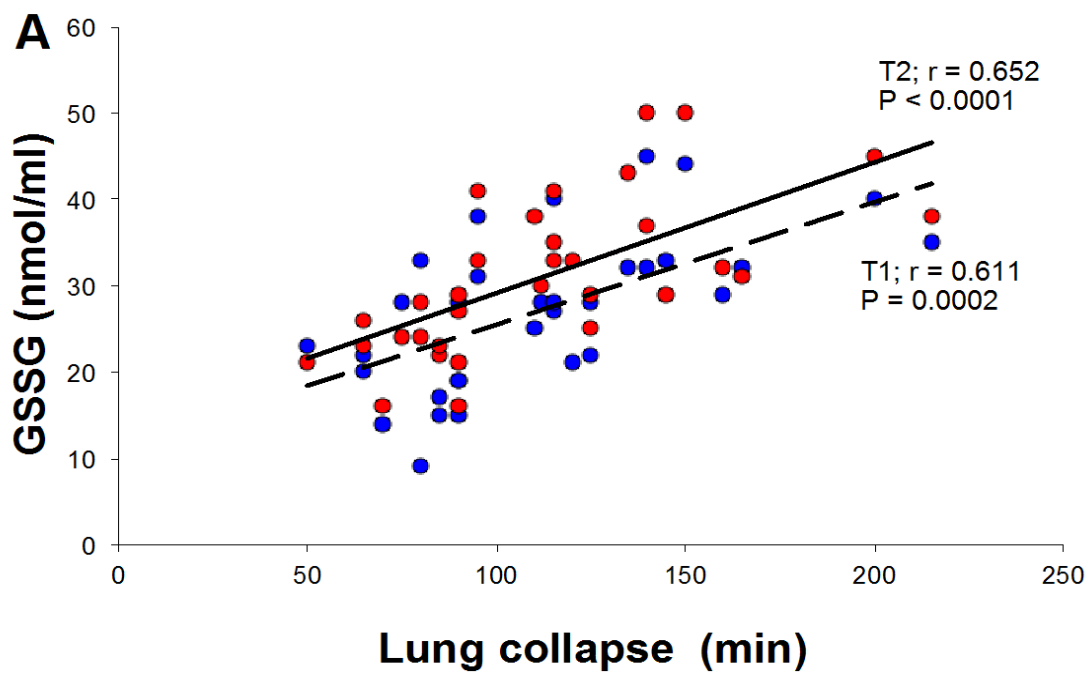
La Tabla V presenta el *time course* de los potenciales redox para el par GSSH-GSH en sangre arterial. En comparación con T0, los potenciales redox en T1-T4 mostraron un aumento significativo de la oxidación del GSH. El potencial redox de oxidación del GSH fue mayor en T2, después de la reexpansión pulmonar inmediatamente después de la lobectomía. Además, se encontró una correlación inversa entre la duración del colapso pulmonar y el potencial redox en T1-T3, particularmente en T2 ($r = -0,4888$; $P = 0,0039$). Los potenciales redox también se correlacionaron de forma directa con los valores arteriales del cociente PO_2/FiO_2 , particularmente a T1 ($r = 0,3627$; $P = 0,0380$) y T4 ($r = 0,4034$; $P = 0,0199$) (Tabla V).

Tabla V: Potencial redox del par GSSG/2GSH y su correlación con el tiempo de colapso pulmonar y el cociente PaO2/FiO2 durante las lobectomías pulmonares.

	T0	T1	T2	T3	T4
Eh (mV)	-209 ± 7.6	-199 ± 7.1 P<0.0001	-197 ± 8.0 P<0.0001	-200 ± 8.3 P<0.0001	-203 ± 8.0 P<0.0018
r_{min}	-0.0145 P=0.9362	-0.3504 P=0.0456	-0.4888 P=0.0039	-0.3811 P=0.0287	-0.0538 P=0.7662
r_{P/F}	-0.0273 P=0.8803	0.3627 P=0.0380	0.2989 P=0.0911	0.0094 P=0.9586	0.4034 P=0.0199

Valores expresados como media \pm desviación estandar (n=32). E_h : potencial redox del par GSSG/2GSH; r_{min} : coeficiente de correlación de Pearson entre E_h y el tiempo de colapso pulmonar; $r_{P/F}$: coeficiente de correlación de Pearson entre E_h y el cociente PaO_2/FiO_2 ; PaO_2 (mmHg): presión parcial de oxígeno; FiO_2 : fracción de oxígeno inspiratorio. Las diferencias de T1–T4 vs. T0 fueron analizadas por el test de la T de Student, para datos apareados y doble cola. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

La duración total del colapso pulmonar y VUP se correlacionó de forma directa con los niveles de glutatión oxidado (GSSG) en sangre arterial en T1 ($r=0,611$; $P = 0,0002$), pero esta correlación fue más fuerte en T2 ($r = 0,652$; $P = 0,0001$) (Figura 21A). Sin embargo, los niveles de glutatión reducido (GSH) no se correlacionaron con los tiempos de VUP (Fig. 21B). El cociente glutatión oxidado/glutatión total, también se correlacionó directamente con el tiempo de VUP en T1 ($r = 0,383$; $P = 0,0306$) y en T2 ($r = 0,436$; $P = 0,0129$) (Figura 21C). La duración del colapso pulmonar también fue fuertemente correlacionada con los niveles en sangre de MDA, tanto en T1 ($r = 0,583$; $P = 0,0005$) como en T2 ($r = 0,738$; $P = 0,0001$) (Figura 21D).



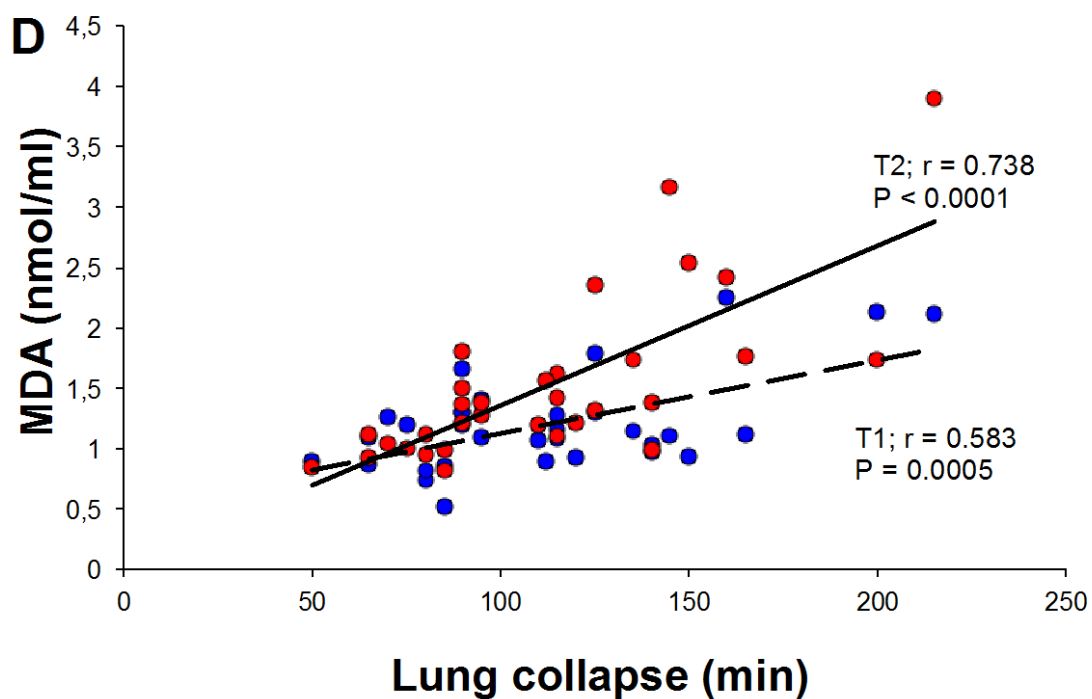
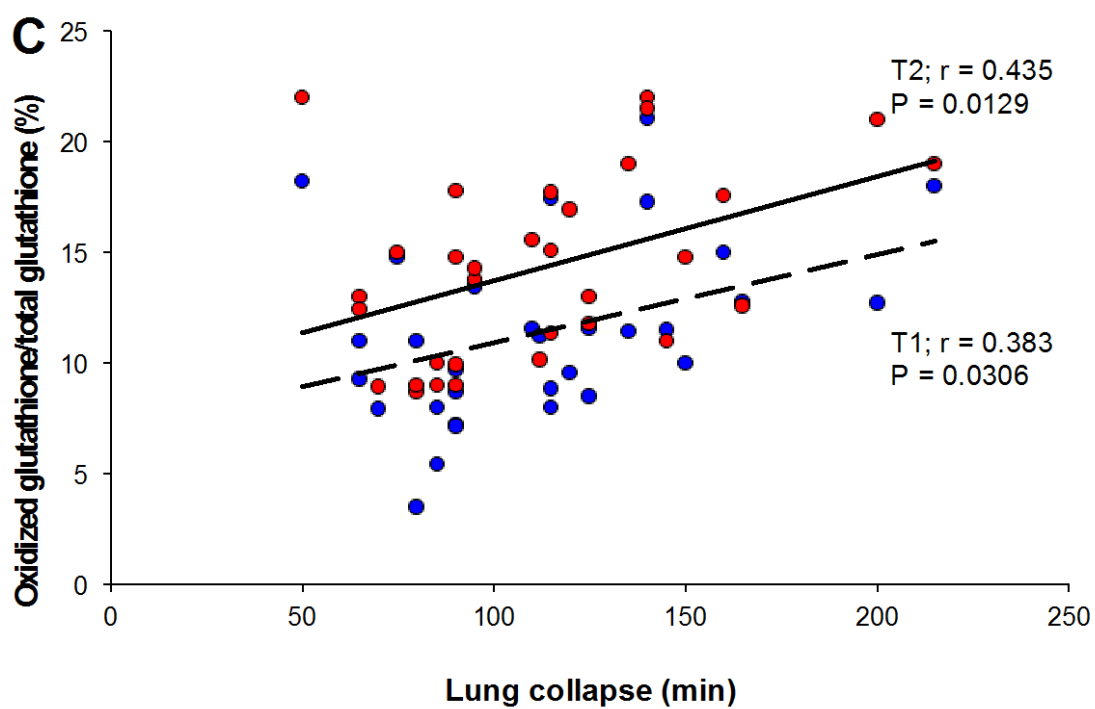
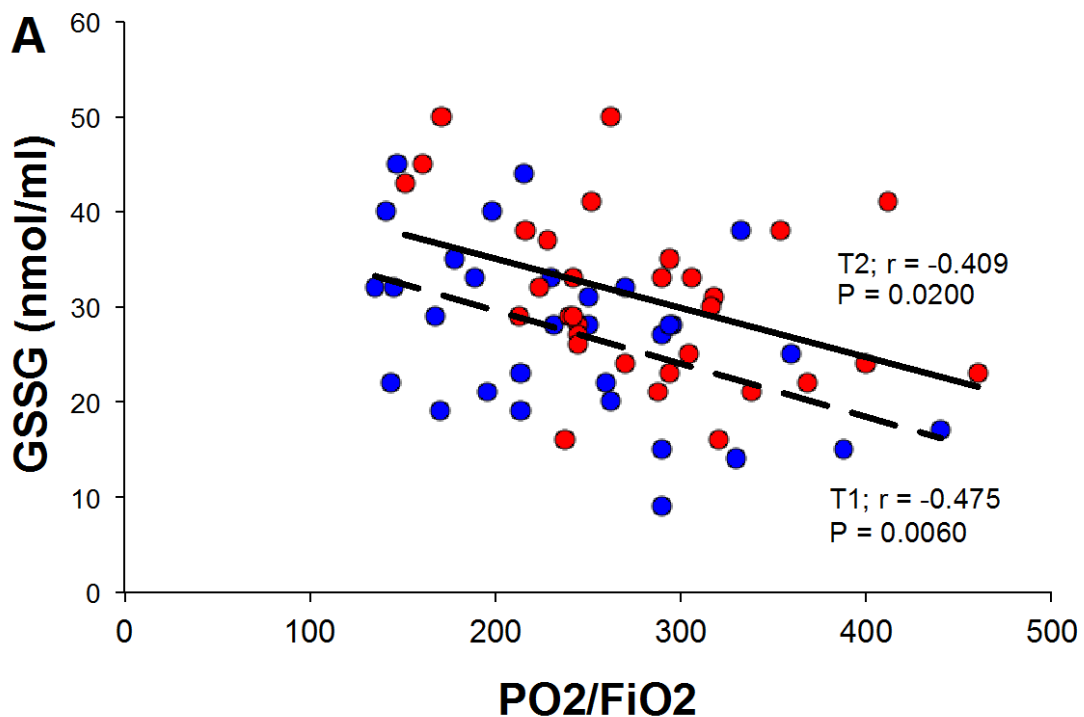
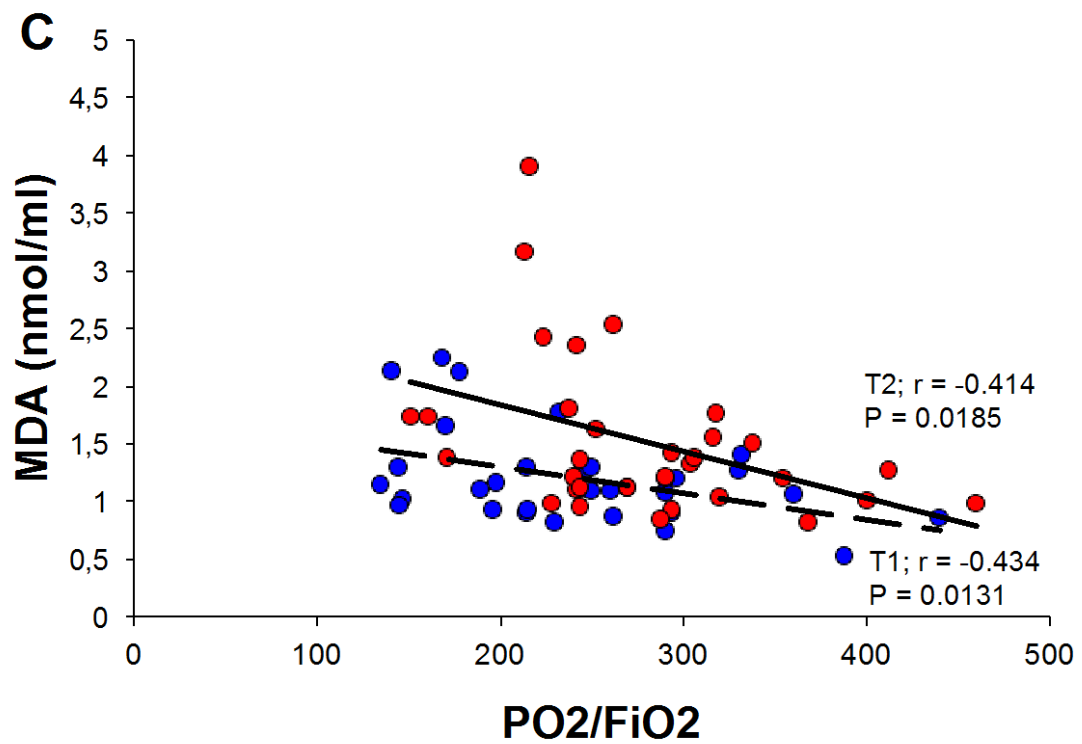
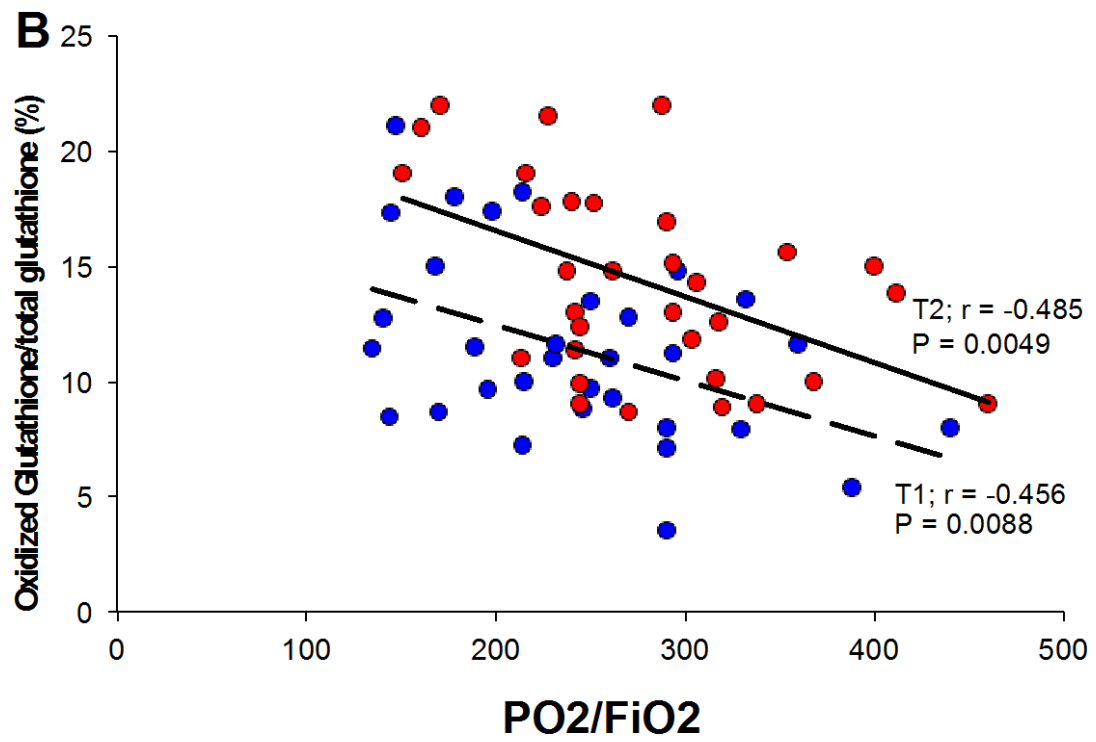


Figura 21. Coeficientes de Pearson (r) para las correlaciones entre tiempo de colapso pulmonar y los marcadores de oxidación del glutatión (GSH, GSSG,

cociente glutatión oxidado/glutatión total) y MDA en sangre, en los tiempos T1 (5 min antes de iniciar la VBP) y T2 (5 min después de iniciar la VBP)(n=32). (A) glutatión oxidado (GSSG). (B) glutatión reducido (GSH). (C) cociente $[(2\text{GSSG}/(\text{GSH} + 2\text{GSSG})) \times 100]$. (D) Malondialdehido (MDA). $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Además, se encontró que las concentraciones en sangre de GSSG, glutatión oxidado/glutatión total y niveles de MDA se correlacionaron inversamente y de forma significativa con los valores de PO_2/FiO_2 en la sangre arterial en T1 y T2 (Fig. 22 A-C). Así mismo, la duración del colapso pulmonar también se correlacionó inversamente con los valores de PO_2/FiO_2 en la sangre arterial, particularmente en T1 (Fig. 22D).





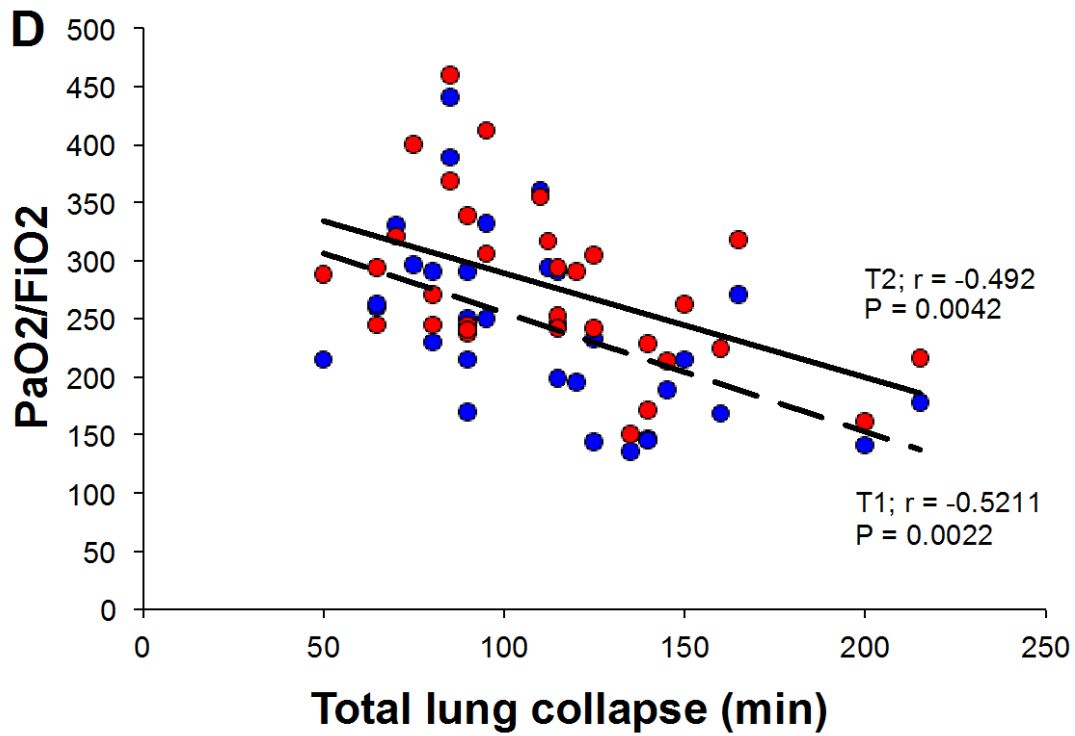


Figura 22. Se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson (r), entre los valores del cociente PaO₂/FiO₂ y los valores de los marcadores de la oxidación del glutatión y de la peroxidación lipídica en sangre en 2 tiempos críticos: T1 (5 minutos antes de reanudar la ventilación de dos pulmones) y T2 (5 minutos después de reanudar la ventilación de dos pulmones) (Fig. 22 A-C). Y entre los valores de los cocientes PaO₂/FiO₂ en sangre arterial y el tiempo total de colapso pulmonar (Fig. 22D). (A) Glutatión oxidado (GSSG). (B) Glutatión oxidado/glutatión total ([2GSSG/(GSH + 2GSSG)]x100). (C) malondialdehído (MDA). Los valores de P <0,05 fueron considerados estadísticamente significativo.

DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

1. Discusión correspondiente a los resultados del estudio: García-de-la-Asunción J, et al. Oxidative lung injury correlates with one-lung ventilation time during pulmonary lobectomy: a study of exhaled breath condensate and blood. *Eur J Cardiothorac Surg* 2015; doi:10.1093/ejcts/ezv207.

La patogénesis de la lesión pulmonar después de lobectomía con VUP parece ser multifactorial, incluyendo los efectos de la manipulación quirúrgica, colapso pulmonar con vasoconstricción hipóxica seguido de una reexpansión y reperfusión, originando una gran liberación de radicales superóxido y producción de citoquinas en los pulmones operados y en los pulmones dependientes (Lases et al. 2000; Misthos et al 2005; Misthos et al. 2006; Cheng et al. 2006). Por lo tanto, debemos considerar que los pacientes sometidos a resección pulmonar y a VUP por un período superior a una hora pueden sufrir arritmias cardíacas debido a la acción de las especies reactivas del oxígeno (ERO) durante la reperfusión (Misthos et al. 2006). Algunos estudios experimentales han encontrado un papel básico de los ERO en la patogénesis de la hipertensión arterial, que pueden ser la causa del edema pulmonar posterior a la resección pulmonar y aumentar con ello el riesgo, al menos en parte, de lesión pulmonar aguda o el síndrome de distrés respiratorio agudo (Liu & Folz 2004; Keegan et al. 2001).

En el presente estudio, en las 24 horas posteriores a las lobectomías pulmonares, se detectaron en las gasometrías arteriales valores de $PaO_2/FiO_2 < 200$ en 4/28 pacientes (14,3%) con mascarilla de oxígeno y $FiO_2 0.5$, lo que indica una lesión pulmonar aguda. Además, la radiografías de tórax presentaban infiltrados de diferente amplitud en los pulmones operados de estos pacientes. Estos pulmones se mantuvieron colapsados durante la VUP, durante períodos de tiempo diferentes, pero cuya media fue de 113 ± 39 minutos. Siete de los pacientes sufrieron arritmias cardíacas (fibrilación auricular), de los cuales, 5 experimentaron un tiempo de colapso más largo que la media. En la presente investigación, las complicaciones observadas durante

las primeras 24 horas de admisión en la Unidad de Cuidados Intensivos postoperatorios fueron comparables a los descritos en estudios anteriores, en los cuales se asoció el grado del estrés oxidativo sufrido por los pacientes con efectos adversos observados durante la estancia en la unidad de cuidados críticos postoperatorios después de la resección pulmonar (Misthos et al. 2006; Li et al 2014).

Durante la VUP, el pulmón operado se mantiene atelectasiado completamente, y muy poco perfundido, porque sólo una pequeña fracción de la sangre del flujo pulmonar pasa a través del pulmón. Una vez terminada la lobectomía y se ha reexpandido el pulmón intervenido, dicho pulmón puede sufrir hasta un 50% reducción de la perfusión sanguínea, debido a la vasoconstricción inducida hipoxia originada por las microatelectasias residuales. Simultáneamente, durante la VUP, el pulmón ventilado experimenta una situación de hiperperfusión y una hiperinflación significativas, las cuales comienzan a producir un daño alveolar difuso por barotrauma/volutrauma que van a condicionar la aparición de trastornos hemodinámicos y de oxigenación durante la lobectomía y en el postoperatorio inmediato (Kozian et al. 2008; Montes et al. 2010; Ribas et al. 2001; Lohser 2008; van der Werff et al. 1997). En este sentido, se ha demostrado que la ventilación de protección pulmonar, reduciendo el volumen tidal durante la VUP, o bien con ventilación controlada por presión son muy recomendables pues disminuyen el daño pulmonar agudo (ALI) y el síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS) post-lobectomía pulmonar (Pardos et al. 2009; Heimberg et al. 2006; Licker et al 2003; Fernandez-Perez et al. 2009).

Como hemos descrito en Tabla II, la cual contiene una descripción completa de los gases de la sangre arterial durante todo el proceso quirúrgico, se observa un aumento de los valores de la PaCO₂ en el tiempo T1, durante la VUP debido a la existencia de una hipoventilación. Asociada a una disminución de la PaO₂ en todos los puntos (T1-T4), particularmente en T1. En consecuencia, los valores del cociente PaO₂/FiO₂ fueron menores en T1 que en T0 (véase la II). Estos resultados parecen reflejar una alteración de la relación ventilación/perfusión, observada durante y después de la VUP, afectando por

tanto a los pulmones dependientes como a los no dependientes (ver Fig. 16C). Después de la reexpansión, el pulmón intervenido puede sufrir una reducción de la perfusión debido a la presencia de microatelectasias residuales que van a impedir una correcta ventilación de todos los segmentos pulmonares, durante la VBP que se van a reflejar en las gasometrías arteriales y radiológicamente (Kozian et al 2008).

La recolección de CAE es un método no invasivo para la obtención de muestras procedentes del tracto respiratorio distal, permitiendo el estudio de trastornos respiratorios en los pacientes, generalmente a través de un dispositivo refrigerado. El CAE contiene muchos mediadores, moléculas y agua, que durante la exhalación difunden directamente desde el líquido que recubre los alvéolos y las vías respiratorias bajas en forma de microgotas de vapor de agua condensado (Horváth et al. 2005; Liang et al. 2012). Nuestro estudio del CAE descubrió un aumento de los niveles de 8-isoprostano producido in vivo por la peroxidación del ácido araquidónico en T1-T4, especialmente en T2 y T3. Estos resultados indican que la lesión oxidativa directa por los ERO comienza durante el período isquémico en T1 y aumenta rápidamente en T2-T3. Las concentraciones de 8-isoprostano en el CAE fueron aproximadamente el doble que en las encontradas en el plasma sanguíneo (ver Fig. 14A y 14E), posiblemente debido a la peroxidación del ácido araquidónico en las células de la membrana alveolar (en proximidad al fluido que cubre los espacios aéreos) y rápida difusión del 8-isoprostano al CAE.

El óxido nítrico (NO) es sintetizado a partir de L-arginina por la enzima NO sintasa, la cual está presente en diversos tipos de células inflamatorias y en las células estructurales dentro de la vía aérea, tales como células epiteliales alveolares, células endoteliales vasculares y células del músculo liso. El NO y el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) reaccionan para formar peroxinitrito, un potente oxidante. Los nitritos (NO_2^-) y los nitratos (NO_3^-) son dos productos finales del metabolismo del NO y del metabolismo del peroxinitrito (Horváth et al. 2005; Szabó et al. 2007). Los niveles de la suma de ambos, $NO_2^- + NO_3^-$ en el CAE, están aumentados en T1 y T2, siguiendo un patrón similar al de los niveles de 8-isoprostanos en el CAE, reflejando lesiones oxidativas que comenzaron

durante el período isquémico (T1) y aumentaron después, con la reexpansión del pulmón (T2). Los niveles medidos de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ en el CAE fueron aproximadamente la mitad de los niveles detectados en el plasma sanguíneo (ver Fig. 14B y 14F), posiblemente porque la principal fuente de NO y anión superóxido fue el endotelio capilar pulmonar (con mayor producción que en los epitelios alveolares). Además, el NO puede inducir vasodilatación pulmonar con una mejora en la perfusión de los alveolos ventilados. Sin embargo, se ha demostrado que este fenómeno agrava daño pulmonar a través de la formación de peroxinitritos y el estrés nitrosativo (Szabó et al. 2007).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) puede ser liberado desde las células inflamatorias y epiteliales, siendo producido por la enzima superóxido dismutasa, a partir del anión superóxido. Por lo tanto, el aumento de los niveles de H_2O_2 en el CAE en el tiempo T2 (ver Fig. 14C) reflejan directamente la producción de ERO en el tracto respiratorio inferior (Dekhuijzen et al. 1996; Lases et al. 2000; Horváth et al. 2005). Los niveles de todos los marcadores de estrés oxidativo en el CAE se correlacionaron directamente con la duración total del colapso pulmonar en T1 y T2 (ver Fig. 15A-15C). En este trabajo, se describe por primera vez una correlación inversa entre los valores del FEV_1 preoperatorios y los niveles de EBC H_2O_2 en T0. Esta correlación está posiblemente relacionada con la inflamación crónica previa de las vías respiratorias, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica o bronquiectasias, especialmente en fumadores actuales o ex-fumadores recientes.

En el estudio actual, el valor del pH en el CAE disminuyó durante el inicio de la reperfusión del pulmón en T2 (después de reanudar la VBP) (ver Fig. 14D). Esta acidificación del CAE fue acompañada por una correlación inversa entre pH y el tiempo total de colapso pulmonar. Esta correlación fue más fuerte durante el período de reexpansión pulmonar (Fig. 15D) y puede estar asociada con activación de neutrófilos y aumento de la lesión oxidativa. En los estudios previos, la acidificación del pH del CAE se asocia con la exacerbación de varios procesos inflamatorios de las vías respiratorias,

activación de neutrófilos y el estrés oxidativo (Horváth et al. 2005; Roca et al. 2010).

Nuestro estudio también ha demostrado unos incrementos simultáneos en los niveles plasmáticos de los marcadores de estrés oxidativo 8-isoprostano y $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (Fig. 14E y 14F), con patrones similares a los encontrados en el CAE (Fig. 14A y 14B) y que también se correlacionaron de forma directa con la duración de la VUP y esta correlación fue más fuerte después de la re-expansión del pulmón (Fig. 16A y 16B). Sin embargo, los niveles de 8-isoprostano en el plasma fueron aproximadamente la mitad de los encontrados en el CAE, posiblemente debido a la proximidad del fluido de revestimiento de las vías aéreas a los lípidos de las membranas alveolares y a su peroxidación. Por el contrario, en el plasma los niveles de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ fueron aproximadamente el doble de los niveles encontrados en el CAE, posiblemente porque la fuente principal de NO fue el endotelio capilar pulmonar. El NO liberado endógeno puede aumentar la formación de aniones peroxinitrito y el estrés nitrosativo, como lo indica el aumento de los niveles en plasmáticos de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$.

Nosotros hemos observado un aumento significativo en la lesión oxidativa durante la VUP, aunque este aumento fue mayor después de reanudar la VBP debido a la mayor producción de aniones superóxido. Por lo tanto, la lesión oxidativa pulmonar después de una situación de hipoxia es bifásica, comenzando con un período hipóxico durante el colapso pulmonar y empeoramiento durante la reexpansión/reoxigenación pulmonar. Aunque aparentemente paradójico, las ERO se generan en condiciones de isquemia o disminución oxígeno. Porque el tránsito de los electrones a través de los citocromos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, se encuentra en una situación o estado redox predominantemente reducido, permitiendo la transferencia o “fuga” de electrones que serán captados por el oxígeno molecular y producción de grandes cantidades de aniones superóxido (O_2^-) *in situ* (Williams et al. 1999; Jordan et al. 2000; Becker 2004). Es importante que nosotros hemos encontrado correlaciones significativas entre los niveles de varios marcadores de daño oxidativo y el tiempo total de colapso pulmonar

tanto en el CAE como en muestras de plasma sanguíneo sangre porque estas correlaciones apoyan la hipótesis de una relación directa entre el tiempo total de colapso pulmonar y la gravedad del daño oxidativo que ocurre durante el colapso pulmonar y posterior reperfusión del pulmón expandido. Por lo tanto, es muy importante reducir el tiempo de colapso pulmonar para minimizar y prevenir complicaciones después de la lobectomía pulmonar.

Las muestras del CAE, también mostraron correlaciones directas entre el efecto prooxidante del H_2O_2 presente en el tracto respiratorio y la formación de 8-isoprostanos y $NO_2^- + NO_3^-$ en el tiempo T1. Indicando así, que la lesión oxidativa también puede ocurrir durante la fase isquemia por el colapso pulmonar durante las lobectomías pulmonares (Fig. 17A y 17B).

En consecuencia, los niveles de H_2O_2 y 8-isoprostano en el CAE en T2 se correlacionan inversamente con la relación PaO_2/FiO_2 en la sangre arterial (Fig. 17C y 17D), destacando una dificultad en el transporte de oxígeno, probablemente debido a alteraciones en la pared capilar del alveolo. Estas conclusiones subrayan la necesidad de nuevos estudios de los mecanismos fisiopatológicos y la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, como por ejemplo el pre-acondicionamiento isquémico remoto, con el fin de prevenir el estrés oxidativo y la lesión pulmonar durante las lobectomías pulmonares (Li et al. 2014; Dulu et al. 2006).

En conclusión, los pacientes con cáncer de pulmón sometidos a lobectomía pulmonar sufren un aumento crítico en la formación de ERO. En este estudio, los niveles de varios marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo aumentaron simultáneamente en el CAE y en sangre durante el colapso pulmonar y la VUP. Sin embargo, estos niveles aumentaron aún más después de la reexpansión pulmonar y el inicio de la VBP. Todos estos incrementos de los niveles de los marcadores de estrés oxidativo se correlacionaron directamente con la duración del colapso pulmonar total y la VUP. Estos hallazgos puede explicar, al menos en parte, la lesión pulmonar aguda que ocurre en algunos pacientes después de lobectomía pulmonar.

2. Discusión correspondiente a los resultados del estudio: José García-de-la-Asunción, et al. Glutathione oxidation correlates with one-lung ventilation time and PO₂/FiO₂ ratio during pulmonary lobectomy. *Redox Report* 2016; 21: 219-226.

Los mecanismos patológicos de la lesión pulmonar y el edema pulmonar después de la resección pulmonar se considera que están relacionados con los efectos de los ERO en el parénquima del pulmón operado, al menos en parte debido al colapso, debido a un daño por hipoxia seguido por una lesión por reoxigenación después de la reexpansión pulmonar (Williams et al. 1999; Williams et al. 1999; Jordan et al. 2000; Lases et al. 2000; Misthos et al. 2005; Misthos et al. 2006; Cheng et al. 2006; Liu & Folz 2004; Keegan et al. 2001; Li et al; 2014). El pulmón intervenido está totalmente atelectasiado durante la lobectomía, con sólo una pequeña fracción de flujo sanguíneo que pasa a través de él. Tras de reanudar la ventilación, el pulmón operado puede sufrir una reducción importante de la perfusión debido a la vasoconstricción hipóxica inducida por las microatelectasias (Kozian et al. 2008).

Al observar los parámetros de la gasometría arterial en los puntos de tiempo (*time course*) a través de las lobectomías pulmonares se evidencia una disminución del pH durante la reperfusión pulmonar, 5 minutos después de haber iniciado la VBP (T2). Además, la PaCO₂ aumentó moderadamente debido a la hipoventilación en T1, 5 minutos antes de reanudar la VBP. En relación con T0, la PaO₂ disminuyó en todos los puntos de medida (T1-T4), particularmente en T1, durante el colapso pulmonar operado. El valor del cociente PaO₂/FiO₂ también disminuyó en todos los tiempos (T1-T4). Estos hallazgos sugieren una alteración de la ventilación/perfusión durante y después del colapso pulmonar operado.

El glutatión reducido (GSH) es la molécula principal intracelular implicada en la defensa antioxidante, capaz de eliminar los peróxidos de hidrógeno y los lipoperóxidos. Los niveles sanguíneos de GSH disminuyeron durante el colapso pulmonar operado (T1). En el mismo tiempo (T1), otros marcadores de estrés oxidativo aumentaron sus niveles en sangre, incluyendo

el glutatión oxidado (GSSG), el cociente glutatión oxidado/glutatión total, el potencial redox del par GSSH-GSH y el malondialdehído (MDA).

Estos hallazgos descritos, pueden ser explicados por la paradójica generación celular de ERO bajo condiciones de isquemia o disminución de oxígeno, utilizando el O₂ residual presente durante la isquemia e hipoxia. En tales situaciones, los citocromos de la cadena de transporte electrónico de las mitocondrias mantienen un status redox reducido, permitiendo la transferencia directa de numerosos electrones al oxígeno, produciendo grandes cantidades de aniones superóxido. Los ERO generados por las mitocondrias pueden funcionar como segundos mensajeros durante la hipoxia, contribuyendo para señalar la transducción y conducir a contracción de las células musculares lisas de las paredes arteriales y conducir a la vasoconstricción pulmonar hipóxica. El concepto de la generación de ERO por las situaciones de isquemia o hipoxia es muy importante, ya que pueden contribuir a las lesiones celulares oxidativas, pero además contribuir a jugar un papel de señalización durante el preacondicionamiento (Kevin et al. 2003; Nohl & Jordan 1986; Vanden Hoek et al. 1998; Becker 2004; Waypa et al. 2001).

Todos los valores medidos mostraron mayores aumentos inmediatamente después de reanudar la VBP, por fenómenos de reperfusión en T2. Estudios en otros órganos apoyan la noción de lesión por reperfusión generada por ERO después de la reintroducción del oxígeno al tejido isquémico (Becker 2004; Ambrosio & Tritto 1999; Park & Lucchesi 1999; García de la Asunción et al. 2012). Nuestros resultados proporcionan la primera evidencia de un aumento de la oxidación del glutatión en área de la investigación, relacionada con el estrés oxidativo en la Cirugía Torácica. Se correlaciona con un desequilibrio en el status redox del glutatión (relación glutatión oxidado/glutatión total). Esto sugiere un mayor estrés oxidativo durante y después de la VUP, probablemente debido a causas multifactoriales, incluyendo colapso pulmonar/hipoperfusión, manipulación tisular y ventilación mecánica de un pulmón dependiente (Baudouin 2003; Jordan et al. 2000).

Nuestro estudio demostró que todos los marcadores de daño oxidativo en la sangre estaban directamente correlacionados con la duración total del colapso pulmonar, y siempre fueron más altos en el tiempo T2 que en T1. Sin embargo, la disminución de los niveles de GSH no se correlacionaron con la duración de la VUP, posiblemente esto fue debido a que los niveles de GSH son excesivos en relación con los niveles de GSSG. Estos resultados son consistentes con la correlación inversa entre las relaciones PO_2/FiO_2 de la sangre arterial y los niveles de GSSG, relación glutatión oxidado/glutatión total, y el MDA antes y después de reanudar la VBP después de la VUP.

Nuestros hallazgos sugieren alteración del transporte de oxígeno en el pulmón operado, que está relacionado con el daño alveolar difuso, causado al menos en parte por los ERO que van a contribuir al deterioro del intercambio gaseoso tras la lobectomía. En el tiempo T2, el potencial redox del par GSSH-GSH en sangre arterial muestra un incremento de los niveles de oxidación en paralelo con los niveles encontrados de GSH y GSSG. Además, la duración del colapso pulmonar fue inversamente correlacionado con el cociente PaO_2/FiO_2 en la sangre arterial, particularmente en T1 (durante el colapso pulmonar) y en T4 (posiblemente debido a la alteración del transporte de oxígeno en el pulmón operado tras su reexpansión). La medida del potencial redox es una prometedora herramienta para la investigación de situaciones normales y patológicas, incluyendo enfermedades mitocondriales de estudios *in vitro* en diferenciación, apoptosis y necrosis celular (Jones 2002; Schafer & Buettner 2001; Enns et al. 2014; Jones et al. 2002).

Es importante destacar que nuestros resultados actuales mostraron que la duración total del colapso pulmonar durante la lobectomía está significativa y directamente correlacionada con la oxidación del glutatión y de otros marcadores de daño oxidativo. Nuestros hallazgos apoyan la hipótesis de una relación directa entre la duración de la VUP y la gravedad del daño durante la reexpansión/reperfusión del pulmón operado en T2-T4. Los pacientes con cáncer sometidos a una experiencia de lobectomía pulmonar aumentan la formación de ERO, con aumento de la oxidación del glutatión y con aumento de los niveles en sangre de otros marcadores de estrés oxidativo durante la

VUP. Pero estos efectos mencionados fueron todavía mayores después de reanudar la VBP y los niveles de los marcadores se correlacionaron con la duración del colapso pulmonar y de la VUP. Además, la oxidación del glutatión y la peroxidación lipídica fueron inversamente correlacionados con los valores de PaO₂/FiO₂ de la sangre arterial durante y después de VUP, posiblemente debido a hipoxia alveolar y la hipoxemia antes y después de reanudar VBP.

3. Consideraciones y limitaciones del estudio

En relación a los agentes anestésicos utilizados en ambos trabajos y en todos los pacientes, solo se utilizó tiopental sódico como anestésico inductor. Pues, cuando se diseñaron estos estudios que hemos desarrollado aquí, se evitaron los anestésicos con un efecto antioxidante demostrado, como es el caso del propofol (2,6-diisopropilfenol) con una estructura química muy parecida a la vitamina E (α -tocoferol), una vitamina liposoluble y de conocida actividad antioxidante *in vivo* e *in vitro*. El propofol por lo tanto se comporta como un potente antioxidante pues tiene capacidad de neutralizar a los ERO e inhibir la peroxidación lipídica (Murphy et al. 1992; Murphy et al. 1993; Alvarez-Ayuso et al 2004). Por lo tanto durante la inducción anestésica y durante el mantenimiento realizado con un anestésico inhalado (sevoflurano) se evitaron los anestésicos que tuviesen efectos antioxidantes. Puesto que los objetivos de los estudios eran precisamente estudiar los efectos de las lobectomías pulmonares sobre los marcadores de estrés oxidativo en el condensado de agua exhalada pulmonar y en sangre.

La elección de un buen biomarcador de la peroxidación lipídica que reflejase lo mas fielmente la realidad del estrés oxidativo durante las lobectomías pulmonares en el CAE y en sangre, nos llevó a pensar en el marcador considerado actualmente más fiable, el 8-isoprostano, por lo tanto fue considerado como el primer objetivo para el estudio del estrés oxidativo intraoperatorio. Fundamentado por el hecho de que esta considerado el mejor marcador para el estudio *in vivo* de la lipoperoxidación en el CAE y en diferentes situaciones patológicas (Samitas et al. 2009; Carpagnano et al.

2004; Piotrowski et al. 2007; Dalaveris et al. 2009; Moloney et al. 2004). Respecto al estudio de la oxidación del glutatión durante las lobectomías pulmonares, no existen antecedentes en este campo, por lo tanto nos propusimos hacer un estudio a este respecto. Puesto que teníamos una larga experiencia en el estudio del metabolismo del glutatión y en el efecto antioxidante del glutatión. Y además contábamos con los medios adecuados para ello (Asensi et al. 1999; Asensi et al. 1994).

Nuestras muestras de CAE se han recogido mediante un sistema propio, consistente en una cámara de vidrio de doble pared enfriada con hielo conectada a la rama espiratoria del circuito de ventilación como recomienda la *ATS Task Force* (Horváth et al. 2005). Puesto que el agua es el principal componente del CAE, la dilución de las moléculas en las muestras del CAE es uno de los aspectos metodológicos mas controvertidos de estos estudios. Aunque no existe ningún *gold standad* hasta la fecha, lo más aconsejable es ventilar de una forma sistematizada a todos los pacientes, con un volumen *tidal* dependiente del peso corporal (ml/kg) y una hidratación similar durante la intervención (Horváth et al. 2005).

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

Basándonos en todos los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. En el CAE de los pacientes sometidos a lobectomía pulmonar aumentan los marcadores de estrés oxidativo, 8-isoprostano, nitritos + nitratos y peróxido de hidrógeno. Simultáneamente, en la sangre aumentan también los niveles de 8-isoprostano y nitritos + nitratos.

2. El aumento de los marcadores de estrés oxidativo en el CAE y en sangre, y el descenso del pH en el CAE se producen durante el colapso pulmonar y la ventilación unipulmonar. Aumentando estos marcadores de estrés oxidativo aún más a partir de la reexpansión-reperusión pulmonar tras la lobectomía.

3. Existe una correlación directa entre el tiempo de colapso pulmonar y de ventilación unipulmonar, con los niveles de los marcadores de estrés oxidativo en el CAE y en la sangre. Siendo más fuerte la correlación durante la reexpansión-reperusión pulmonar.

4. Durante la lobectomía pulmonar aumenta la oxidación del glutatión, que se expresa en aumentos del cociente glutatión oxidado/glutatión total, el cual se correlaciona directamente con la duración del colapso pulmonar.

5. Durante las lobectomías pulmonares, con el colapso pulmonar y la ventilación unipulmonar, empeoran de los niveles de oxigenación en la sangre arterial (PaO_2/FiO_2), manteniéndose así hasta el postoperatorio inmediato.

6. El empeoramiento de la oxigenación arterial (PaO_2/FiO_2) durante las lobectomías pulmonares, se correlaciona inversamente con la duración del colapso pulmonar y también con los niveles de todos los marcadores de estrés oxidativo estudiados.

FUTURAS INVESTIGACIONES

VIII. FUTURAS INVESTIGACIONES

Un estudio que se encuentra ya en fase avanzada de recogida de datos y que se titula: *Preacondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión en la lobectomía pulmonar: un estudio sobre la respuesta inflamatoria y el HIF-1 α* . Cuya investigadora principal es la actual doctoranda Eva García del Olmo.

Con este estudio, se intenta demostrar si el preacondicionamiento remoto disminuye los niveles plasmáticos de TNF-1 α y la IL-6, dos interleucinas proinflamatorias y la proteína C-reactiva. Pero además, y sobre todo, comprobar si el preacondicionamiento remoto aumenta los niveles plasmáticos de IL-10, una interleucina anti-inflamatoria y si estos aumentos se correlacionan con un aumento de los niveles plasmáticos del factor de transducción HIF-1 α . Puesto que el factor de transducción HIF-1 α , sería el responsable de un aumento de la expresión del gen responsable de la síntesis de la IL-10. Como ha quedado demostrado recientemente en un elegante estudio experimental, donde la IL-10 es una de los factores implicados en los mecanismos responsables del preacondicionamiento remoto por isquemia-reperfusión (Caia et al. 2013).

BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abe K, Mashimo T, Yoshiya I. Arterial oxygenation and shunt fraction during one-lung ventilation: a comparison of isoflurane and sevoflurane. *Anesth Analg* 1998; 86: 1266–1270.

Alvarez-Ayuso L, Calero P, Granado F, Jorge E, Herrero C, Torralba A, et al. Antioxidant effect of gamma-tocoferol supplied by propofol by propofol preparation (diprivan) during ischemia-reperfusion in experimental lung transplantation. *Transplant International* 2004; 17: 71-77.

Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999; 138: S69–S75.

Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases of aging. *Science* 1983; 221: 1256-1264.

Ames BN, Shigenaga M, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915-7922.

Antus B, Barta I. Exhaled breath condensate pH in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2012; 75: 178-180.

Asensi M, Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Estrela, JM, Viña J. A high-performance liquid chromatography method for measurement of glutathione in biological samples. *Anal Biochem* 1994; 217: 323–328.

Asensi M, Sastre J, Pallardó JV, Lloret A, Lehner M, García-de-la-Asunción J, et al. Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicador of oxidative stress status and DNA damage. *Methods Enzimol* 1999; 299: 267-676.

Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med* 1978; 298: 659-668.

Baudouin SV. Lung injury after thoracotomy. *Br J Anaesth* 2003; 91(1): 132-142.

Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 461–470.

Bendich A. Vitamin C safety in humans. In: *Vitamin C in health and disease* 1997; pp: 45-55. (Packer L & Funch K). Marcel Dekker (NY).

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. *Am J Respir Crit Car Med* 1994; 149: 818-824.

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. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135(2): 247-254.

Boveris A and Chance BC. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 143: 707-716.

Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1972; 128: 617-630.

Brigelius R, Merckel C, Akerboon T, Sies H. Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 2529–2534.

Caia Z, Luob W, Zhanb H, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 α is required for remote ischemic preconditioning of the heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110:17462-17467

Carpagno 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). *Eur J Pharmacol* 2004; 505: 169-175.

Chatterjee S, Nieman GF, Christie JD, Fisher AB. Shear stress-related mechano-signaling with lung ischemia: lessons from basic research can inform lung transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 307:L668–L680.

Cheeseman KH and Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 588-603.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003; 278: 36027–36031.

Chen F, Date H. Update on ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2015; 20: 515-520.

Cheng Y-J, Chan K-C, Chien C-T, Sun W-Z, Lin C-J. Oxidative stress during 1-lung ventilation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 132: 513-518.

Chow CW, Abreu MTH, Suzuki T, Downey GP. Oxidative stress and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 427-431.

Dalaveris E, Kerenidi T, Katsabeki-Katsafli A, Kiropoulos T, Tanou K, Gourgoulianis 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: 219-225.

Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects. *J Biol Chem* 1987; 262: 9895-9901.

de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 490-511.

Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wieters PL, van Herwaarden CL, et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 813-816.

Del Rio D, Steward AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovas* 2005; 15: 316–328.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of the cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.

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 Med* 2008; 34: 1654-1661.

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: 73-78.

Enns GM, Moore T, Le A, Atkuri K, Shah MK, Cusmano-Ozog K, et al. Degree of glutathione deficiency and redox imbalance depend on subtype of mitochondrial disease and clinical status. *PLOS ONE* 2014; 9(6):e100001. doi:10.1371/journal.pone.0100001

Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271: 195-204.

Evans CA. On catalytic decomposition of hydrogen peroxide by the catalase of blood. *Biochem J* 1907; 2: 133-155.

Fernandez-Perez ER, Sprung J, Afessa B, Warner DO, Vachon CM, Schroeder DR, et al. Intraoperative ventilator settings and acute lung injury after elective surgery: a nested case control study. *Thorax* 2009; 64: 121-127.

Freeman BA, Grapo J. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.

Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am J Med* 1994; 97 (3A): 5S-13S.

Fridovich I. Superoxide dismutase. *Adv Enzymol* 1974; 41: 35-97.

Fridovich I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem* 1997; 272 (30): 18515-18517.

Fridovich I. Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. En: Free radicals in biology. Ed. Pryor WA; New York, *Academic Press* 1986: 239-246.

García de la Asunción J, del Olmo ML, Sastre J, Pallardó FV, Viña J. Zidovudine (AZT) causes an oxidation of mitochondrial DNA in mouse liver. *Hepatology* 1999; 29: 985-987.

García-de-la-Asunción, 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* 2012; 17: 194-199.

García-de-la-Asunción J, García-del-Olmo E, Perez-Griera J, Martí F, Galan G, Morcillo A, et al. Oxidative lung injury correlates with one-lung ventilation time during pulmonary lobectomy: a study of exhaled breath condensate and blood. *Eur J Cardiothorac Surg* 2015; Sep;48(3):e37-44 doi:10.1093/ejcts/ezv207.

García-de-la-Asunción J, García-del-Olmo E, Galan G, Guijarro R, Martí F, Badenes R, et al. Glutathione oxidation correlates with one-lung ventilation time and PO₂/FiO₂ ratio during pulmonary lobectomy, *Redox Report* 2016, 21: 219-226.

Gilbert HF. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. In: Meister A, (ed.) *Advances in enzymology*. New York: Wiley Interscience; 1990: p. 169–173.

Grace P. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81: 637-647.

Gessner C, Kuhn H, Seyfarth H-J, Pankau H, Winkler J, Schauer J, et al. Factors influencing breath condensate volume. *Pneumologie* 2001; 55: 414-419.

Griffith OW, Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Nat Acad Sci USA* 1985; 82 (14): 4668-4672.

Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad Biol Med* 1999; 27: 922-935.

Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-724.

Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1995; 7: 601-617.

Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nutr* 1996; 16: 33-50.

Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (6): 774-797.

Heimberg C, Winterhalter M, Strüber M, Piepenbrock S, Bund M. Pressure-controlled versus volume-controlled one-lung ventilation for MIDCAB. *Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 54: 516-520.

Hoeijmakers JH. DNA damage, aging and cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 1475-1485.

Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, and co-authors the ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26: 523-548.

Horváth I, Donnelly LE, Kiss A, Kharitonov SA, Lim S, Chung KF, et al. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1998; 158: 1042-1046.

Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: 1067–1082.

Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol* 2002; 348: 93–112.

Jones DP, Mody VC Jr., Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg P Jr. Redox analysis of human plasma allows separation of prooxidant events of aging from decline in antioxidant defences. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1290–1300.

Jordan S, Mitchell JA, Quinlan GJ, Goldstraw P, Evans TW. The pathogenesis of lung injury following pulmonary resection. *Eur Resp J* 2000; 15: 790-799.

Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis R. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012; 298: 229-319.

Keegan A, Morecroft I, Smillie D, Hicks MN, MacLean MR. Contribution of the 5-HT (1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT (1B)-receptor knockout mice and the 5-HT (1B/1D)-

receptor antagonist GR127935. *Cir Res* 2001; 89: 1231–1239.

Ketterer B. Detoxification reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica* 1986; 16:957-973.

Kevin LG, Camara AK, Riess ML, Novalija E, Stowe DF. Ischemic preconditioning alters real-time measure of O₂ radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H566–H574.

Kozian A, Schilling T, Fredén F, Maripuu E, Röcken C, Strang C et al. One-lung ventilation induces hyperperfusion and alveolar damage in the ventilated lung: an experimental study. *Br J Anaesthesth* 2008; 100: 549–559.

Lases EC, Durkens VA, Gerritsen WB, Haas FJ. Oxidative stress after lung resection therapy: A pilot study. *Chest* 2000; 117(4): 999-1003.

Li C, Xu M, Wu Y, Li Y-S, Huang W-Q, Liu K-X. Limb remote ischemic preconditioning attenuates lung injury after pulmonary resection under propofol-remifentanil anesthesia. A randomized controlled study. *Anesthesiology* 2014; 121: 249-259.

Liang Y, Yeligar SM, Brown LA. Exhaled breath condensate: a promising source for biomarkers of lung disease. *The Scientific World J* 2012; ID 217518, 7 pages. Doi: 10.1100/2012/217518.

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. *Anesth Analg* 2003; 97: 1558-1565.

Liu JQ, Folz RJ. Extracellular superoxide enhances 5-HT-induced murine pulmonary artery vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: L111–L118.

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. *Anesth Analg* 2011; 112(4): 877-883.

Lohser J. Evidence-based management of one-lung ventilation. *Anesthesiology Clin* 2008; 26: 241-272.

Marshall BE, Marshall C, Benumof J, Saidman LJ. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in dogs: effects of lung segment size and oxygen tension. *J Appl Physiol* 1981; 51: 1543-1551.

Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; 1 (6): 441-445.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.

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. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 27: 379-383.

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. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 29: 591-595.

Moloney ED, Mumby SE, Gajdocsi R, Cranshaw JH, Kharitonow SA, Quinlan GJ et al. Exhaled breath condensate detects markers of pulmonary inflammation after cardiothoracic surgery. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 64-69.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.

Montes FR, Pardo DF, Charrís H, Tellez LJ, Garzón JC, Osorio C. Comparison

of two protective lung ventilator regimes on oxygenation during one-lung ventilation: a randomized controlled trial. *J Cardiothorac Surg* 2010; 5: 99.

Morgan GE, Maged SM, Murray MJ. *Clinical Anesthesiology*, 4^a Edición 2007; pag. 549-589; Ed. El Manual Moderno, Mexico.

Morrow JD, Harris TM, Roberts LJ. Non cyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem* 1990; 184 (1): 1-10.

Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9383–9387.

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. *J Biol Chem* 1994; 269 (6): 4317-4326.

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. *N Engl J Med* 1995; 332: 1198–1203.

Murphy PG, Myers DS, Davies MJ, Webster NR, and Jones JG. The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol). *Br J Anaesth* 1992; 68: 613-618.

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. *Eur J Anaesthesiol* 1993; 10: 261-266.

Nair U, Bartsch H, Nair J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. *Free Radic Biol Med* 2007; 43:1109–1120.

Nannini LJ, Quintana R, Bagilet DH, Druetta M, Ramirez M, Nieto R, et al. Exhaled breath condensate pH in mechanically ventilated patients. *Med Intensiva* 2013; 37:593-599.

Niki E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 1987; 44: 227-253.

Nohl H, Jordan W. The mitochondrial site of superoxide formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 138: 533–539.

Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 580-590.

Orchand CH, Sanchez de León R, Sykes MK. The relationship between hypoxic pulmonary vasoconstriction and arterial oxygen tension in the intact dog. *J Physiol* 1983; 338: 61–74.

Pacher P, Beckman JS, Llaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 345-424.

Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 1905–1912.

Pardos PC, Garutti I, Piñeiro P, Olmedilla L, de la Gala F. Effects of ventilator mode during one-lung ventilation on intraoperative and postoperative arterial oxygenation in thoracic surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2009; 23: 770-774.

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): 1059-1065.

Philpot RM. Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues. *Methods Enzymol* 1991; 206: 623-631.

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: 589- 596.

Ribas J, Jimenez MJ, Roca J, Gomar C, Canalis M, Rodriguez-Rosin R. Gas exchange and pulmonary hemodynamics during lung resection in patients at increased risk: relationship with preoperative exercise testing. *Chest* 2001; 120: 852-859.

Roberts LI, Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1345 (2): 121-135.

Roca O, Gomez-Ollés S, Cruz MJ, Muñoz X, Griffiths MJD, Masclans JR. Mechanical ventilation induces changes in exhaled breath condensate of patients without lung injury. *Respir Med* 2010; 104: 822–828.

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. *Respir Med* 2009; 103: 750-756.

Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1191–212.

Sayah DM, Mallavia B, Liu F, et al. Neutrophil extracellular traps are pathogenic in primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191: 455–463.

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): 171-182.

Sies H, Brigelius R, Wefers H, Muller A, Cadenas E. Cellular redox changes and response to drugs and toxic agents. *Fundam Appl Toxicol* 1983; 3(4): 200-208.

Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem* 1986; 25: 1058-1071.

Sies H. Glutathione and its cellular functions. *Free Rad Biol Med* 1999; 27: 916-921.

Simic MG, Taylor KA. Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms. In: Oxygen radicals in biology and medicine. Ed. Simic MG, Taylor KA, Ward JF, Sonntag C. New York, Ed. *Plenum Press* (1988).

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* 2002; 22: 721-727.

Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-15.

Spector T. Oxypurinol as an inhibitor of xanthine oxidase-catalyzed production of superoxide radical. *Biochem Pharmacol* 1988; 37 (2): 349-352.

Stadman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257: 1220-1224.

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277: 44784–44790.

Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:662–680.

Taber DF, Morrow JD, Roberts LJ. A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins* 1997; 53 (2): 63-67.

Tolvert NE, Essner E. Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J Cell Biol* (3 Pt 2): 271s-283s.

Tsukioka T, Nishiyama N, Iwata T, Nagano K, Tei K, Suehiro S. Preoperative serum oxidative stress marker as a strong indicator of nodal involvement in clinical stage I lung adenocarcinoma. *Int J Clin Oncol* 2012; 17: 250–255.

Van der Werff YD, van der Houwen HK, Heijmans PJ, Duurkens VAM, Leusink HA, van Heesewijk HPM, et al. Postpneumectomy pulmonary edema. A retrospective analysis of incidence and possible risk factors. *Chest* 1997; 111: 1278-1284.

Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Shumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 18092–18098.

Ward JPT. Point: hypoxic pulmonary vasoconstriction is mediated by increased production of reactive oxygen species. *J Appl Physiol* 2006; 101: 993–995.

Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Cir Res* 2001; 88: 1259–1266.

West J. *Respiratory physiology*. 8^o Edition 2008; pag. 37-52. Lippincott Williams & Wilkins.

Weyker PD, Webb CAJ, Kiamanesh D, Flynn BC. Lung ischemia reperfusion injury: a bench-to-beside review. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2012; 17: 28-43.

Williams EA, Quinlan GJ, Goldstraw P, Gothard JW, Evans TW. Postoperative

lung injury and oxidative damage in patients undergoing pulmonary resection. *Eur Respir J* 1998; 11: 1028-1034.

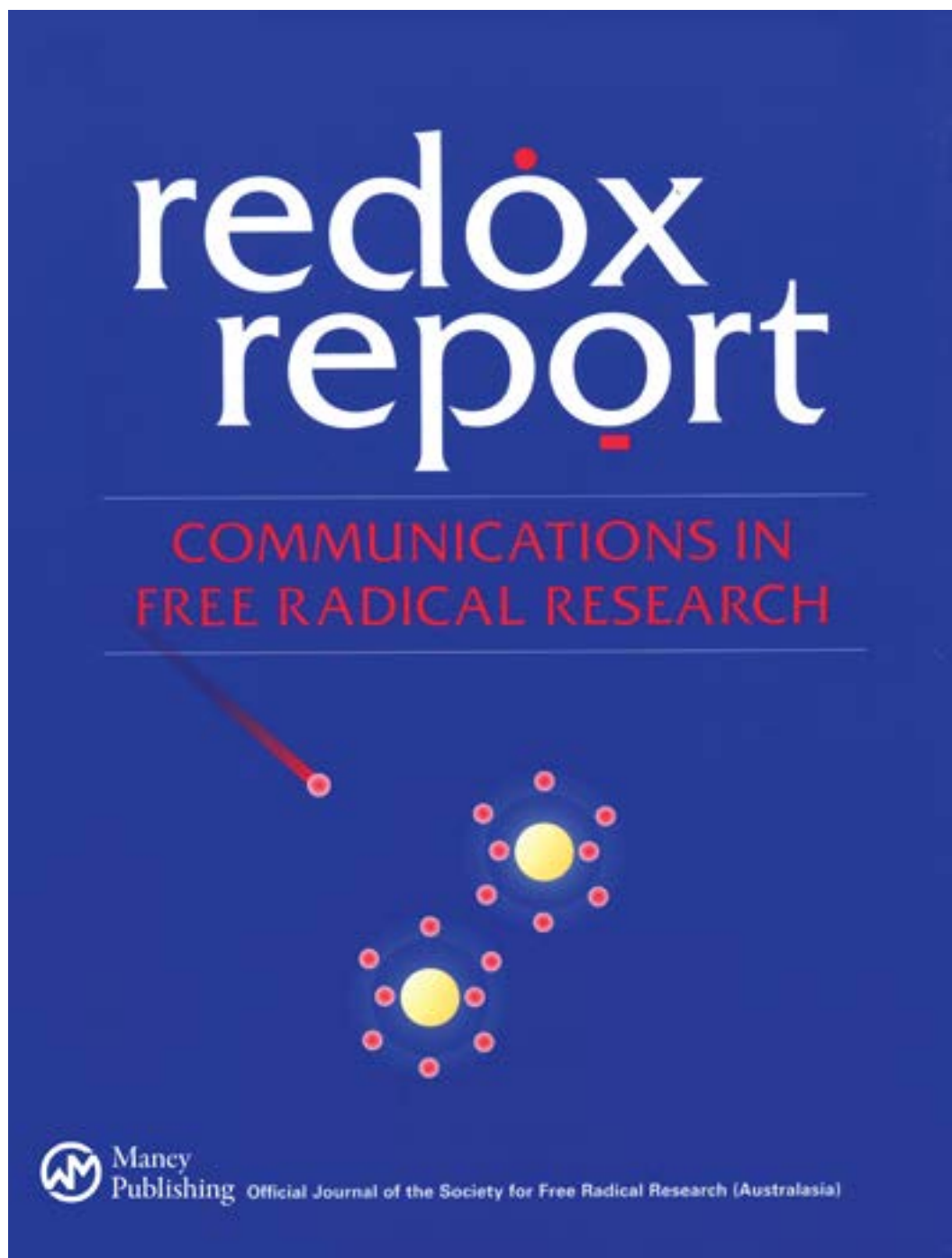
Williams E, Quinlan G, Anning P, Goldstraw P, Evans T. Lung injury following pulmonary resection in the isolated, blood-perfused rat lung. *Eur Respir J* 1999; 14: 745-750.

Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach ChN Jr, Sunderman W Jr. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 1987; 33: 214-220.

Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004; 134: 489–492.

X. ANEXOS

ANEXO 1:



Cite this article as: García-de-la-Asunción J, García-del-Olmo E, Perez-Griera J, Martí F, Galan G, Morcillo A *et al.* Oxidative lung injury correlates with one-lung ventilation time during pulmonary lobectomy: a study of exhaled breath condensate and blood. *Eur J Cardiothorac Surg* 2015; doi:10.1093/ejcts/ezv207.

Oxidative lung injury correlates with one-lung ventilation time during pulmonary lobectomy: a study of exhaled breath condensate and blood

José García-de-la-Asunción^{a*}, Eva García-del-Olmo^b, Jaume Perez-Griera^c, Francisco Martí^d, Genaro Galan^d, Alfonso Morcillo^d, Richard Wins^d, Ricardo Guijarro^b, Antonio Arnau^b, Benjamín Sarriá^e, Miguel García-Raimundo^a and Javier Belda^a

^a Department of Anaesthesiology and Critical Care, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Fundación Investigación Clínico de Valencia, Instituto de Investigación Sanitaria (INCLIVA), Valencia, Spain

^b Department of Thoracic Surgery, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

^c Laboratory of Biochemistry, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain

^d Department of Thoracic Surgery, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain

^e Department of Pharmacology, University of Valencia, Valencia, Spain

* Corresponding author. Department of Anaesthesiology and Critical Care, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Fundación Investigación Clínico de Valencia-INCLIVA, Av. Blasco Ibañez 17, 46010 Valencia, Spain. Tel: +34-96-3862653; fax: +34-96-3987831; e-mail: josegarcidelaasuncion@gmail.com. (J. García-de-la-Asunción).

Received 31 January 2015; received in revised form 3 May 2015; accepted 7 May 2015

Abstract

OBJECTIVES: During lung lobectomy, the operated lung is collapsed and hypoperfused; oxygen deprivation is accompanied by reactive hypoxic pulmonary vasoconstriction. After lung lobectomy, ischaemia present in the collapsed state is followed by expansion-reperfusion and lung injury attributed to the production of reactive oxygen species. The primary objective of this study was to investigate the time course of several markers of oxidative stress simultaneously in exhaled breath condensate and blood and to determine the relationship between oxidative stress and one-lung ventilation time in patients undergoing lung lobectomy.

METHODS: This single-centre, observational, prospective study included 28 patients with non-small-cell lung cancer who underwent lung lobectomy. We measured the levels of hydrogen peroxide, 8-iso-PGF₂α, nitrites plus nitrates and pH in exhaled breath condensate (*n* = 25). The levels of 8-iso-PGF₂α and nitrites plus nitrates were also measured in blood (*n* = 28). Blood samples and exhaled breath condensate samples were collected from all patients at five time points: preoperatively; during one-lung ventilation, immediately before resuming two-lung ventilation; immediately after resuming two-lung ventilation; 60 min after resuming two-lung ventilation and 180 min after resuming two-lung ventilation.

RESULTS: Both exhaled breath condensate and blood exhibited significant and simultaneous increases in oxidative-stress markers immediately before two-lung ventilation was resumed. However, all these values underwent larger increases immediately after resuming two-lung ventilation. In both exhaled breath condensate and blood, marker levels significantly and directly correlated with the duration of one-lung ventilation immediately before resuming two-lung ventilation and immediately after resuming two-lung ventilation. Although pH significantly decreased in exhaled breath condensate immediately after resuming two-lung ventilation, these pH values were inversely correlated with the duration of one-lung ventilation.

CONCLUSIONS: During lung lobectomy, the operated lung is collapsed and oxidative injury occurs, with the levels of markers of oxidative stress increasing simultaneously in exhaled breath condensate and blood during one-lung ventilation. These increases were larger after resuming two-lung ventilation. Increases immediately before resuming two-lung ventilation and immediately after resuming two-lung ventilation were directly correlated with the duration of one-lung ventilation.

Keywords: One-lung ventilation • Oxidative lung injury • 8-Isoprostane • Hydrogen peroxide • Nitrites and nitrates • Exhaled breath condensate

INTRODUCTION

Patients undergoing lung lobectomy are at risk for developing severe lung injury because the operated lung is completely collapsed and hypoperfused for a period of time. A collapsed lung is also hypoperfused due to reactive hypoxic pulmonary vasoconstriction, which optimizes gas exchange and helps to prevent arterial hypoxaemia in response to alveolar hypoxia [1, 2]. Additionally, the production of reactive oxygen species (ROS) increases during tissue hypoxia, particularly at two sites in the mitochondrial respiratory chain (Complex I and Complex III) [3, 4]. This increase contributes to additional vasoconstriction [3, 5] and may cause mitochondrial dysfunction via oxidative damage. Thus, in patients undergoing lobar resection, relative ischaemia during lung collapse is followed by expansion-reperfusion and injury attributed to the production of ROS [6, 7].

To date, few investigations have assessed these issues in detail. For example, increases in hydrogen peroxide (H_2O_2) levels in exhaled breath condensate (EBC) and urinary malondialdehyde levels were larger in lobectomy patients than in pneumonectomy patients after pulmonary resection (30 min and 1 day after surgery) [8]. An increase in malondialdehyde blood levels due to lung re-expansion in lung cancer patients after lung resection has been associated with adverse cardiovascular effects [9, 10]. In patients undergoing video-assisted thoracoscopic surgery with one-lung ventilation (OLV), resuming two-lung ventilation (TLV) induced massive superoxide production, which was associated with lung re-expansion and re-oxygenation [11]. A recent investigation [12] showed that ROS stimulate lymphatic metastasis via the epithelial-to-mesenchymal transition and lymphangiogenesis in the tumour microenvironment. Correlation between serum ROS levels and nodal extension may assist the development of new diagnosis and treatment strategies [12].

EBC collection is a non-invasive method for obtaining samples from the lower respiratory tract. EBC contains a large number of biomarkers, including isoprostanes, nitrogen oxides and H_2O_2 [13]; pH changes in EBC have been reported in patients undergoing lung lobectomy for cancer [13, 14]. The isoprostanes (such as 8-iso-PGF 2α) are a family of products from arachidonic acid that are generated through the non-enzymatic action of ROS. Increased blood levels of 8-isoprostane have thus been considered a reliable index of *in vivo* lipid peroxidation due to their chemical stability [13, 15, 16]. Nitrites (NO_2^-) and nitrates (NO_3^-) are end products of nitric oxide (NO) and peroxyxynitrite anion metabolism that are present in the fluid, lining the epithelium of the respiratory tract. NO and superoxide anion (O_2^-) react to form peroxyxynitrite anion, which is a powerful oxidant [13, 17]. H_2O_2 is a volatile ROS produced from the conversion of superoxide anion to H_2O_2 by superoxide dismutase; it is released from inflammatory and epithelial cells of the respiratory system and reflects oxidative injury to the lungs [8, 13].

The aim of the current study was to investigate whether oxidative injury occurs during OLV and after resuming TLV in lung cancer patients undergoing lung lobectomy. We undertook the first evaluation of whether OLV duration directly correlates with the levels of oxidative-stress markers in both EBC and blood samples at specific times. We also determined whether the levels of H_2O_2 (a pro-oxidant) directly correlate with increases in the levels of 8-iso-PGF 2α and $NO_2^- + NO_3^-$ in EBC, or whether these levels indirectly correlate with the ratio of partial oxygen pressure (PaO $_2$) to fraction of inspired oxygen (FiO $_2$), a parameter for detecting impaired intrapulmonary gas exchange and oxygenation.

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

Twenty-eight patients (24 men and 4 women) were scheduled for elective lung lobectomy for clinical stage I (7 patients) or stage II (21 patients) non-small-cell lung cancer. Patients were prospectively and observationally studied in a single centre. Patient age ranged from 40 to 81 years. All patients were admitted to the post-surgical intensive care unit within 24 h of lobectomy. The exclusion criteria included previously received radiotherapy or chemotherapy, ingested antioxidant vitamins, systemic active infections and body temperature $>38^\circ C$. The Ethics Committee at Hospital Clínico Universitario de Valencia (Spain) approved the study protocol. Informed consent was obtained from each patient.

Anaesthesia and lung ventilation

Sodium thiopental (3–5 mg/kg) and fentanyl (2 $\mu g/kg$) were induced intravenously. After the induction of anaesthesia, endotracheal intubation was performed with a double-lumen tube (37 or 39 French as appropriate) and facilitated with rocuronium bromide (0.6 mg/kg). Intubation was adjusted via a fibre-optic bronchoscope after the patient was turned to the lateral decubitus position. Anaesthesia was subsequently maintained with sevoflurane (2%), fentanyl and rocuronium bromide.

During TLV, the lungs were ventilated in volume-controlled mode for a tidal volume of 8 ml/kg ideal body weight, a respiratory rate of 12–14 breaths/min and an inhaled:exhaled ratio of 1:2. During OLV, the non-dependent lung was collapsed and open to the air, whereas the dependent lung was ventilated with a tidal volume of 6 ml/kg, a respiratory rate of 14–18 breaths/min and an inhaled:exhaled ratio of 1:2 to maintain an end-tidal CO $_2$ <40 mmHg. Positive end-expiratory pressures of 5–7 cmH $_2$ O and FiO $_2$ 0.5 were used during TLV and OLV to maintain O $_2$ saturation $>92\%$. FiO $_2$ was increased momentarily only when O $_2$ saturation fell below 92% and when the recruitment manoeuvres to the ventilated lung were not effective.

Before anaesthesia induction, a thoracic epidural catheter was inserted for postoperative pain management. Standard anaesthesia-monitoring parameters, including arterial oxygen saturation, invasive blood pressure in the radial artery, heart rate and end-tidal CO $_2$, were measured during anaesthesia. All patients were extubated after surgery in the operating room and transferred to the post-surgery intensive care unit, where they remained for at least 24 h after surgery and received oxygen (FiO $_2$ 0.5) through a facemask.

Collection of exhaled breath condensate

After anaesthesia induction, air expired from 25 of 28 patients was collected through a cold-collecting system which consisted of a double-walled glass chamber cooled with wet ice and connected to the expiratory port of the ventilator. Approximately, 2 ml of EBC was collected at five time points. The samples were immediately deaerated with argon (350 ml/min for 10 min [13, 14]) and stored at $-80^\circ C$ until analysis. EBC samples were collected from all patients at specific time points: T0, preoperatively (baseline); T1, during the 20 min of OLV immediately preceding the resumption of TLV; T2, during the 20 min immediately after resuming TLV; T3,

60 min after resuming TLV and T4, 180 min after resuming TLV. EBC pH was measured in a 0.4-ml aliquot with a blood gas analyser (ABL 88 Flex apparatus, Radiometer, Copenhagen, Denmark).

Blood sampling

Arterial blood samples were collected from all patients at five time points: T0, preoperatively (baseline); T1, during OLV, 5 min before resuming TLV; T2, 5 min after resuming TLV; T3, 60 min after resuming TLV and T4, 180 min after resuming TLV. Blood samples were collected (BD Vacutainer PST II tubes with lithium heparin, BD-Plymouth, UK) from a radial artery line and then centrifuged at 3000 rpm for 12 min. Plasma was separated and stored at -80°C until analysis. Arterial blood pH, PaO_2 , partial carbon dioxide pressure (PaCO_2) and $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio (a useful parameter for detecting impaired intrapulmonary gas exchange and oxygenation) were analysed with an ABL 88 Flex apparatus (Radiometer).

Determination of the levels of oxidative-stress markers in exhaled breath condensate and blood

The levels of 8-iso-PGF 2α , a stable prostaglandin-like product formed from arachidonic acid by the action of ROS, were measured using a competitive enzyme immunoassay (EIA kit from Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA). Less than half of total plasma 8-iso-PGF 2α is present as a free acid; most of it is esterified into phospholipids. Therefore, determination of the total plasma levels of 8-iso-PGF 2α requires alkaline hydrolysis prior to enzyme immunoassay [18].

In vivo, the final products of NO metabolism are NO_2^- and NO_3^- . The relative proportion of these products is variable and cannot be predicted with certainty. Thus, the best index of total NO production is the sum of NO_2^- and NO_3^- . Total $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ levels were measured by converting NO_3^- to NO_2^- using nitrate reductase. The Griess reagent was used to convert NO_2^- into a compound that was measured with a colorimetric assay at 540 nm (nitrate/nitrite colorimetric assay kit, Cayman Chemical Co.) [19].

H_2O_2 is unstable in EBC; therefore, after collection, aliquots were rapidly frozen at -80°C until analysis [13]. H_2O_2 levels were measured within 1 week after sample collection via the oxidation of ferrous ions to ferric ions by H_2O_2 under acidic conditions (a colorimetric assay kit, Cayman Chemical Co.). Ferric ion binds the dye xylenol orange to form a stable complex, which can be measured at 595 nm.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation. Normality was assessed with the Shapiro-Wilk test. Data were parametric and normally distributed. One-way analysis of variance for repeated measures (time course: T1-T4 vs T0) was performed to assess the effect of OLV time and subsequent lung re-expansion on the levels of oxidative-stress markers in EBC and blood. When the comparisons were significant, *post hoc* multiple comparisons with Tukey's test (or the Games-Howell test for unequal variances) were used to compare values between sampling times. Correlations between total time of lung collapse and the levels of several oxidative-stress markers (8-iso-PGF 2α , $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, H_2O_2 , PO_2/FiO_2

ratio and pH from EBC and arterial blood samples were analysed using Pearson's correlation coefficient (*r*). Results were considered statistically significant when $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using the SPSS statistical software, version 16.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Demographic, preoperative functional parameters and clinical data from the intraoperative period are summarized in Table 1. Mean values during surgery were as follows: temperature, $35.9 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; arterial pressure, 82 ± 6 mmHg; heart rate, 80 ± 19 beats/min. No patients had difficulty maintaining lung isolation during the operation. It was not necessary to implement intermittent TLV by decreasing O_2 saturation during OLV. Only 6/28 patients (21.4%) intermittently required more than 50% oxygen during OLV. All patients were extubated without incident at the end of surgery. No epidural analgesia failures occurred in any patient.

During the first 24 h of admission to the postoperative intensive care unit, the average patient body temperature was $37.36 \pm 0.33^{\circ}\text{C}$, with an average white blood cell count of 9750 ± 3700 leucocytes/ml. Arterial blood gas analysis of 4/28 patients (14%) revealed $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratios < 200 (the mean ratio for all patients was 254 ± 56). Chest radiography of 5/28 patients (18%) during the first 24 h indicated varying degrees of pulmonary infiltrate on the side of the operated lung. Cardiac arrhythmia (atrial fibrillation) was observed in 7/28 patients (25%) at some point during their stay in the intensive care unit. No patients developed sepsis or died during their stay in the intensive care unit.

Table 1: Demographic and clinical data during the intraoperative period

Age (years)	64.5 \pm 10.2
Sex (male/female)	24/4
Body mass index (kg/m^2)	26.2 \pm 4.1
Current smokers (n)	9
Ex-smokers (n)	17
Never smoked	2
Preoperative FEV $_1$ (l)	2.11 \pm 0.64
Preoperative FVC (l)	2.80 \pm 0.72
Preoperative FEV $_1$ /FVC	0.77 \pm 0.23
Side (right/left)	17/11
Location	
Right upper lobe	14
Right middle lobe	1
Right lower lobe	2
Left upper lobe	9
Left lower lobe	2
Histology	
Adenocarcinoma	10
Squamous carcinoma	17
Other	1
OLV time (min)	113 \pm 39
Surgery duration (min)	152 \pm 37
Intraoperative fluid load (l)	1.40 \pm 0.33
Intraoperative urine (l)	0.55 \pm 0.32

Values are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 28$). FEV $_1$: forced expiratory volume in 1 s; FVC: forced vital capacity; OLV: one-lung ventilation.

Table 2: Time course of arterial blood gas parameters during lung lobectomy

Time points	T0	T1	T2	T3	T4
pH	7.37 ± 0.04	7.36 ± 0.03	7.35 ± 0.04	7.37 ± 0.03	7.37 ± 0.04
PaCO ₂	36.4 ± 3.4	39.0 ± 2.4*	37.9 ± 2.8	37.4 ± 1.3	37.0 ± 3.4
PaO ₂	170 ± 31	136 ± 31***	151 ± 33	146 ± 32*	147 ± 26*
PaO ₂ /FiO ₂	329 ± 70	245 ± 80***	284 ± 74	293 ± 65	295 ± 52

Values are expressed as mean ± standard deviation (n = 28). Differences relative to baseline (T0) were assessed with pairwise comparisons with *post hoc* analysis of variance.

PaO₂: partial oxygen pressure; FiO₂: fraction of inspired oxygen; PaCO₂: partial carbon dioxide pressure.

*P < 0.05.

**P < 0.01.

***P < 0.001.

Table 2 summarizes arterial blood gas parameters from all patients at various points during lobectomy. PaCO₂ values were significantly higher ($P < 0.05$) at time point T1 during OLV than at T0 (baseline). Relative to T0, PaO₂ decreased at T1, T3 and T4, particularly T1 (during OLV; $P < 0.001$), and remained low at T3 and T4 ($P < 0.05$). PaO₂/FiO₂ was significantly lower at T1 ($P < 0.001$) than at T0.

The time course of the levels of oxidative-stress markers and pH values in EBC and in arterial blood samples appears in Fig. 1. In EBC samples, the levels of 8-iso-PGF2 α , a stable end product of the oxidation of cellular phospholipids, increased at T1–T4 relative to T0, particularly at T2 and T3 after lung re-expansion ($P < 0.001$). The levels of NO₂⁻ + NO₃⁻ in EBC also significantly increased at T1 and T2 relative to T0 ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively). Significant increases in EBC H₂O₂ levels occurred at T2 relative to T0 ($P < 0.05$). We detected a significant and inverse correlation ($r = -0.3926$; $P = 0.0470$) between preoperative FEV₁ values and H₂O₂ levels in EBC at T0. EBC pH significantly decreased at T2 ($P < 0.05$). 8-iso-PGF2 α levels in arterial blood were significantly higher at T1–T3 than at T0 ($P < 0.05$, $P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively); however, these levels were approximately half the levels detected in EBC samples. The blood levels of NO₂⁻ + NO₃⁻ were significantly higher at T2 than at T0 ($P < 0.01$), but blood levels were approximately double those in EBC.

The levels of all oxidative-stress markers in EBC samples were significantly and positively correlated with total duration of lung collapse at T1 and similarly after lung re-expansion at T2 (8-iso-PGF2 α , $P < 0.001$; NO₂⁻ + NO₃⁻, $P < 0.05$; H₂O₂, $P < 0.01$; Fig. 2A–C). A significant decrease in EBC pH occurred at T2 (Fig. 1D), and pH was inversely correlated with OLV duration at T1 and T2 ($P < 0.05$; Fig. 2D).

In arterial blood, 8-isoprostane levels and OLV duration at T1 were positively correlated ($r = 0.443$; $P < 0.05$) and this correlation was stronger ($r = 0.567$; $P < 0.01$) after lung re-expansion (at T2; Fig. 3A). For NO₂⁻ + NO₃⁻, correlation with OLV duration was significant ($r = 0.467$; $P < 0.05$) only at T2 (Fig. 3B). In arterial blood, PaO₂/FiO₂ ratio and pH were inversely correlated with the duration of total lung collapse at T1 and T2: PaO₂/FiO₂ (at T1, $r = -0.525$, $P < 0.01$ and at T2, $r = -0.505$, $P < 0.01$) and pH (at T1, $r = -0.369$, $P < 0.05$; and at T2, $r = -0.452$, $P < 0.05$) similarly at T1 and T2 (Fig. 3C and D). To our knowledge, these are the first observations of such inverse correlations.

We detected a positive correlation between the levels of H₂O₂ (a potent pro-oxidant formed by the dismutation of superoxide radicals) and the levels of 8-iso-PGF2 α (which reflect lipid

peroxidation and lung damage) in EBC at T1 during lung collapse ($r = 0.389$; $P < 0.05$), but not during lung re-expansion at T2 (Fig. 4A). EBC levels of NO₂⁻ + NO₃⁻ (end products of NO and peroxynitrite anion metabolism) were even more strongly correlated ($r = 0.528$; $P < 0.01$) with H₂O₂ levels at T1 (Fig. 4B). However, H₂O₂ levels (Fig. 4C) and 8-iso-PGF2 α levels (Fig. 4D) in EBC were significantly and inversely correlated with PaO₂/FiO₂ ratio in arterial blood at T2; these correlations were particularly strong with H₂O₂ levels ($r = -0.531$; $P < 0.01$), suggesting a disturbance in oxygen transport induced by oxidative damage to the alveolar membrane.

DISCUSSION

The pathogenesis of lung injury after lobectomy with OLV appears to be multifactorial, including effects from surgical manipulation, lung collapse with hypoxic vasoconstriction followed by lung re-expansion and reperfusion with large releases of radical superoxides and cytokine production in the operated and dependent lungs [8–11]. Therefore, patients undergoing lung resection and OLV for more than 1 h can suffer cardiac arrhythmia due to ROS generation during reperfusion [10]. Some experimental studies have found a basic role of ROS in the pathogenesis of pulmonary hypertension, which may underlie post-resectional lung oedema and increase the risk, at least in part, of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [20, 21].

Here, 24 h after lung lobectomy, we detected arterial blood gas PaO₂/FiO₂ < 200 in 4/28 patients (14.3%) wearing an oxygen mask (FiO₂ 0.5), indicating acute lung injury. Moreover, chest radiography revealed infiltrates in the operated lung of these patients; these lungs were collapsed during OLV for periods that were longer than the mean (113 ± 39 min) duration of OLV. Seven patients suffered cardiac arrhythmia (atrial fibrillation), with 5/7 patients experiencing a collapse time longer than the mean. In the present investigation, the complications observed within 24 h of admission to the postoperative intensive care unit were comparable with those reported in previous studies [10, 22] that associated the degree of oxidative stress with major adverse effects after lung resection.

During OLV, the operated lung remains atelectatic as well as hypoperfused because only a small fraction of pulmonary blood flow passes through the lung. After lung re-expansion, the operated lung may suffer ~50% reduced perfusion due to vasoconstriction induced by microatelectasis and hypoxic exposure.

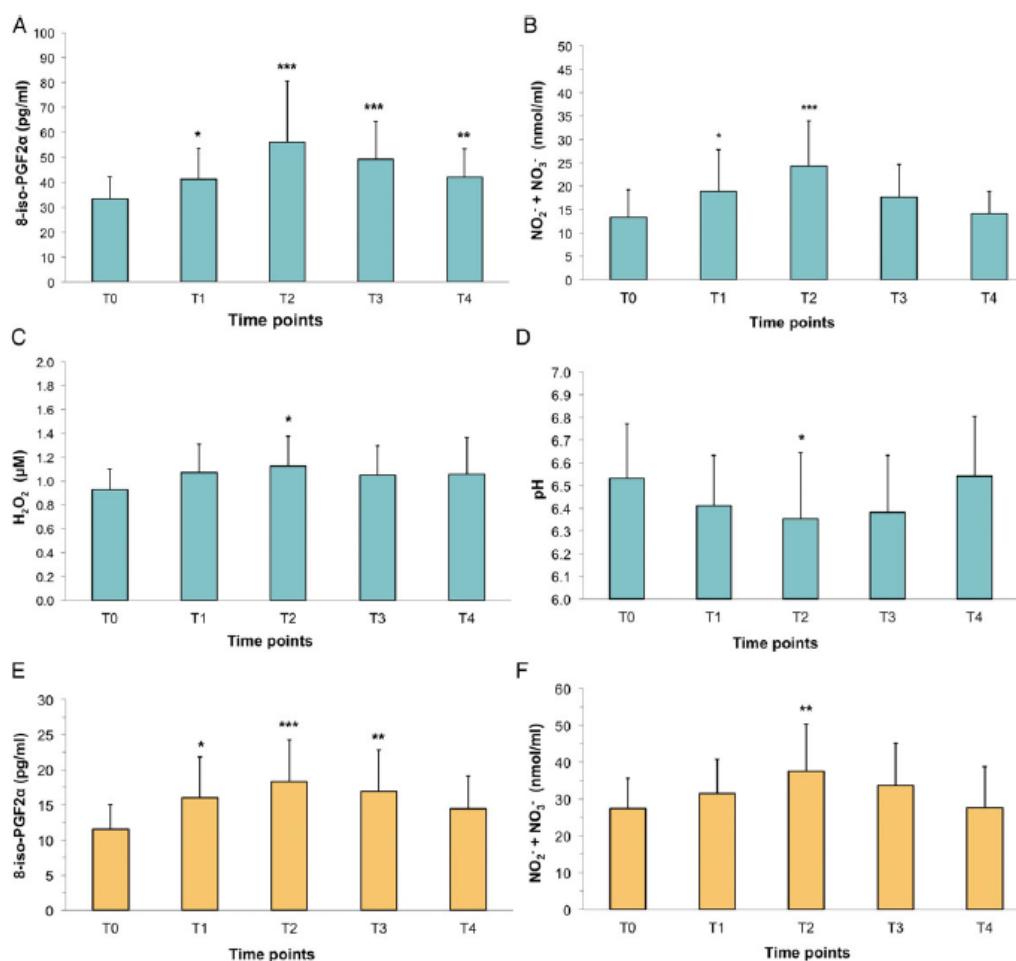


Figure 1: Time course of the levels of oxidative-stress markers in EBC (green bars: A, B, C, D) and in arterial blood (yellow bars: E, F). (A, E) 8-iso-PGF2 α . (B, F) NO₂⁻ + NO₃⁻. (C) H₂O₂. (D) pH. Samples were collected preoperatively (T0); during OLV, immediately before resuming TLV (T1), immediately after resuming TLV (T2); 60 min after resuming TLV (T3); and 180 min after resuming TLV (T4). Values are expressed as mean \pm standard deviation (EBC, n = 25; blood, n = 28). Differences relative to baseline (T0) were *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. EBC: exhaled breath condensate; OLV: one-lung ventilation; TLV: two-lung ventilation; H₂O₂: hydrogen peroxide; NO₂⁻: nitrites; NO₃⁻: nitrates.

Simultaneously, during OLV, the ventilated lung may experience significant hyperperfusion and hyperinflation and begin to undergo diffuse alveolar damage [23]. Table 2 (and Fig. 3C and D) contains a complete description of arterial blood gases throughout the surgical process, data that were not previously reported. We observed an increase in PaCO₂ at T1 during OLV due to hypoventilation. PaO₂ decreased at all time points, particularly T1, during OLV; thus, PaO₂/FiO₂ values were lower at T1 than at T0 (see Table 2). These results seem to reflect a ventilation/perfusion mismatch during and after OLV in both dependent and non-dependent lungs (see Fig. 3C). After re-expansion, the lung may experience reduced perfusion due to microatelectasis, but during OLV, the dependent lung undergoes diffuse alveolar disturbances due to hyperperfusion and hyperinflation [23].

EBC collection is a non-invasive method for sampling the lower respiratory tract in humans, usually through a refrigerated device. EBC contains many mediators and during exhalation, molecules and water directly diffuse from fluid covering alveoli and airways into microdroplets of condensed water vapour [13]. Our study of EBC uncovered an increase in 8-iso-PGF2 α produced *in vivo* by the peroxidation of arachidonic acid at T1–T4, especially at T2 and T3. These results indicate that direct oxidative injury from ROS begins during the ischaemic period at T1 and quickly increases at T2–T3. 8-iso-PGF2 α levels in EBC were approximately double those in blood plasma (see Fig. 1A and E), possibly due to peroxidation of arachidonic acid in cells of the alveolar membrane (in close proximity to fluid covering the airspaces) and rapid diffusion of 8-iso-PGF2 α into EBC.

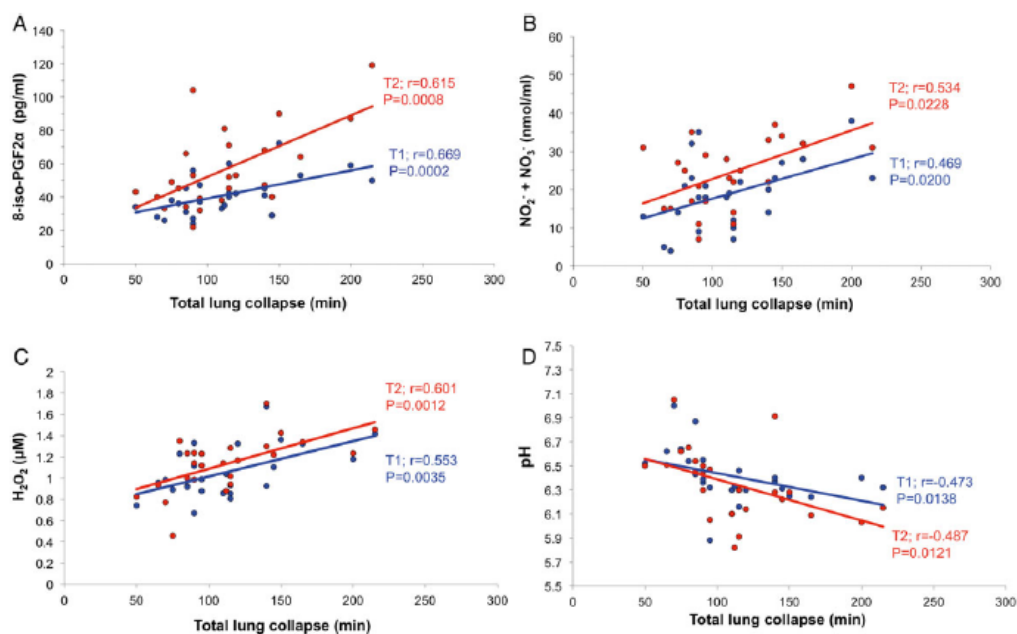


Figure 2 Pearson correlation coefficients (r) between total time of lung collapse (min) and the levels of oxidative-stress markers and pH in EBC samples during OLV, immediately before resuming TLV (T1; blue circles and blue lines) and immediately after resuming TLV (T2; red circles and red lines). (A) 8-iso-PGF2 α . (B) NO $_2^-$ + NO $_3^-$. (C) H $_2$ O $_2$. (D) pH. $P < 0.05$ was considered statistically significant ($n = 25$). EBC: exhaled breath condensate; OLV: one-lung ventilation; TLV: two-lung ventilation; H $_2$ O $_2$: hydrogen peroxide; NO $_2^-$: nitrites; NO $_3^-$: nitrates.

NO synthesized from L-arginine by NO synthase is present in various inflammatory and structural cell types within the airway, such as alveolar epithelial cells, vascular endothelial cells and smooth muscle cells. NO and superoxide anion react to form peroxynitrite, a powerful oxidant NO $_2^-$ and NO $_3^-$ are end products of NO and peroxynitrite metabolism [13, 17]. The levels of NO $_2^-$ + NO $_3^-$ in EBC increased at T1 and T2 in a pattern similar to that of 8-iso-PGF2 α levels in EBC, reflecting oxidative injury that began during the ischaemic period (T1) and increased after lung re-expansion (T2). The levels of NO $_2^-$ + NO $_3^-$ in EBC were approximately half the levels detected in blood plasma (see Fig. 1B and F), possibly because the main source of NO and superoxide anion was the pulmonary capillary endothelium (with more production than in alveolar epithelia). In addition, NO may induce selective pulmonary vasodilatation with improved perfusion of ventilated alveoli. However, this phenomenon has been shown to aggravate lung damage via peroxynitrite formation and nitrosative stress [17].

H $_2$ O $_2$ can be released from both inflammatory and epithelial cells and produced by superoxide dismutase through conversion of the superoxide anion. Therefore, the increased H $_2$ O $_2$ levels in EBC at T2 (see Fig. 1C) directly reflect the production of free radicals in the lower respiratory tract [8, 13]. The levels of all oxidative-stress markers in EBC were positively correlated with total duration of lung collapse at T1 and T2 (see Fig. 2A–C). Here, we provide the first report of a weak inverse correlation between preoperative FEV $_1$ values and EBC H $_2$ O $_2$ levels at T0. This correlation is possibly related to previous chronic airway inflammation such as chronic obstructive pulmonary disease or bronchiectasis, especially in current smokers or recent ex-smokers.

In the current study, EBC pH decreased during the onset of lung reperfusion at T2 (after resuming TLV) (see Fig. 1D). This acidification was accompanied by an inverse correlation between pH and total time of lung collapse; this correlation was stronger during the lung re-expansion period (Fig. 2D) and may be associated with neutrophil activation and increased oxidative injury. EBC acidification is associated with the exacerbation of several inflammatory airway pathologies, neutrophil activation and oxidative stress [13, 19].

We also demonstrated simultaneous increases in blood levels of the oxidative-stress markers 8-iso-PGF2 α and NO $_2^-$ + NO $_3^-$ (Fig. 1E and F), with patterns similar to those found in EBC (Fig. 1A and B) and were positively correlated with OLV duration and this correlation was stronger after lung re-expansion (Fig. 3A and B). However, blood 8-iso-PGF2 α levels were approximately half those in EBC, possibly due to the proximity of airway-lining fluid to lipid peroxidation in alveolar membrane cells. Conversely, blood NO $_2^-$ + NO $_3^-$ levels were approximately double those in EBC, possibly because the main source of NO was the pulmonary capillary endothelium. Endogenous, released NO may increase peroxynitrite anion formation and nitrosative stress, yielding increased levels of NO $_2^-$ + NO $_3^-$ in blood.

We observed a significant increase in oxidative injury during OLV, although this increase was greater after resuming TLV due to the extensive production of superoxide anions. Therefore, oxidative lung injury after hypoxic insult is biphasic, starting with a hypoxic period during lung collapse and worsening during lung re-expansion/re-oxygenation. Although seemingly paradoxical, ROS are generated under conditions of ischaemia or lowered

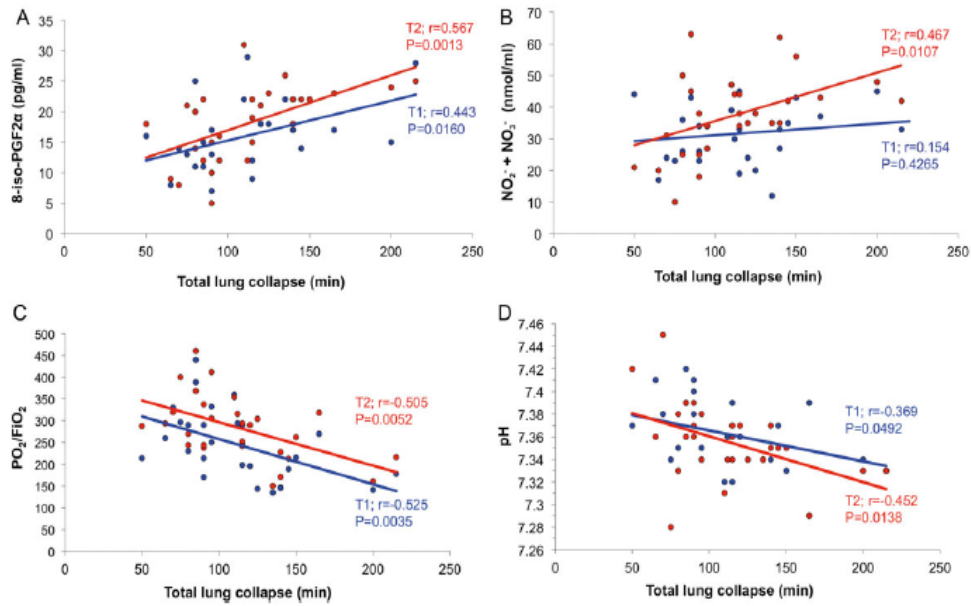


Figure 3: Pearson correlation coefficients (r) between total time of lung collapse (min) and the levels of oxidative-stress markers, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio and pH in arterial blood samples during OLV, 5 min before resuming TLV (T1; blue circles and blue lines) and 5 min after resuming TLV (T2; red circles and red lines). (A) 8-iso-PGF2 α . (B) $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$. (C) $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio. (D) pH. $P < 0.05$ was considered statistically significant ($n = 28$). EBC: exhaled breath condensate; OLV: one-lung ventilation; PaO_2 : partial oxygen pressure; FiO_2 : fraction of inspired oxygen; NO_2^- : nitrites; NO_3^- : nitrates.

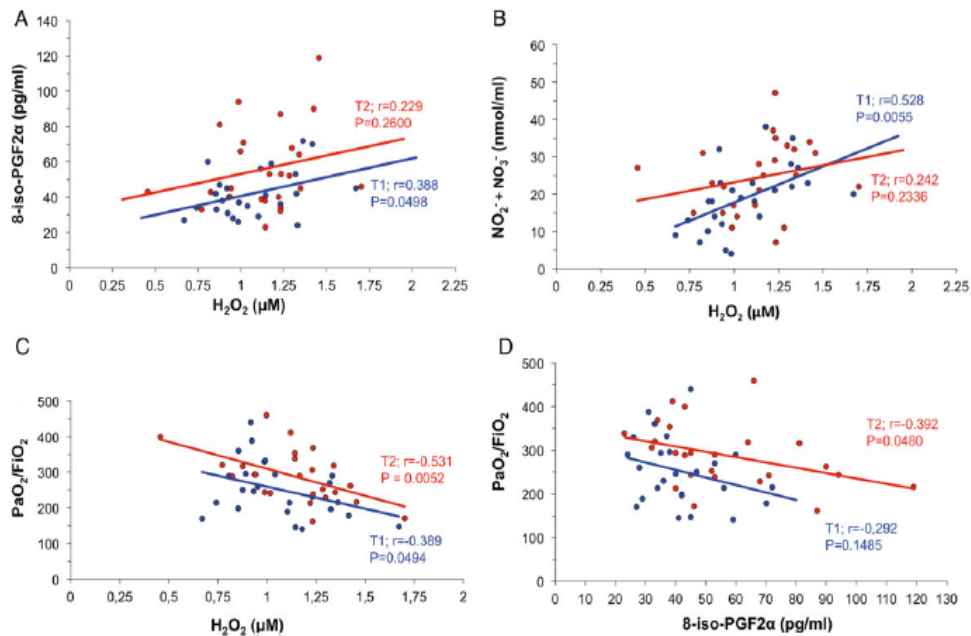


Figure 4: Pearson correlation coefficients (r) of the levels of oxidative-stress markers (in EBC) with H_2O_2 or with $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio during OLV, immediately before resuming TLV (T1; blue circles and blue lines) and immediately after resuming TLV (T2; red circles and red lines). (A) H_2O_2 and 8-iso-PGF2 α . (B) H_2O_2 and $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$. (C) H_2O_2 and $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio. (D) 8-iso-PGF2 α and $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio. $P < 0.05$ was considered statistically significant ($n = 25$). EBC: exhaled breath condensate; OLV: one-lung ventilation; TLV: two-lung ventilator; PaO_2 : partial oxygen pressure; FiO_2 : fraction of inspired oxygen; NO_2^- : nitrites; NO_3^- : nitrates; H_2O_2 hydrogen peroxide.

oxygen. Cytochromes in the mitochondrial respiration chain pass into a redox-reduced state, allowing the transfer of electrons to molecular oxygen and producing large amounts of superoxide anions [24]. It is important that we uncovered significant correlations between the levels of several markers of oxidative damage and the total time of lung collapse in both EBC and blood samples because these correlations support the hypothesis of a direct relationship between the total time of lung collapse and the severity of oxidative damage that occurs during lung collapse and subsequent reperfusion in the expanded lung. Thus, it is critical to shorten the time of lung collapse to minimize pulmonary oxidative damage and to prevent complications after lung lobectomy.

EBC samples also displayed at T1-positive relationships among the pro-oxidant effect of H_2O_2 levels and the formation of 8-iso-PGF 2α and $NO_2^- + NO_3^-$, indicating that oxidative injury began during ischaemia and lung collapse (Fig. 4A and B). However, H_2O_2 and 8-iso-PGF 2α levels in EBC at T2 were significantly and inversely correlated with PaO_2/FiO_2 ratio in arterial blood (Fig. 4C and D), highlighting a difficulty in oxygen transport that is likely due to alterations in the alveolus capillary wall. These findings underscore the need for further studies of pertinent pathophysiological mechanisms and the need to develop new therapeutic strategies, such as remote ischaemic preconditioning, in order to prevent oxidative stress and lung injury during lung lobectomy [22, 25].

In conclusion, cancer patients undergoing lung lobectomy suffer a critical increase in ROS formation; here, the levels of markers of oxidative and nitrosative stress increased simultaneously in EBC and in blood during lung collapse and OLV. However, these levels increased more after the resumption of TLV and were directly correlated with the duration of total lung collapse and OLV. These findings may explain, at least partly, the acute lung injury that occurs in some patients after pulmonary lobectomy.

Funding

This study was supported by the Spanish Government (Instituto de Salud Carlos III, grant PI07/0836 to José García-de-la-Asunción).

Conflict of interest: none declared.

REFERENCES

- [1] Marshall BE, Marshall C, Benumof J, Saidman LJ. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in dogs: effects of lung segment size on oxygen tension. *J Appl Physiol* 1981;51:1543-51.
- [2] Orchand CH, Sanchez de León R, Sykes MK. The relationship between hypoxic pulmonary vasoconstriction and arterial oxygen tension in the intact dog. *J Physiol* 1983;338:61-74.
- [3] Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003;278:36027-31.
- [4] St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002;277:44784-90.
- [5] Ward JPT. Point: hypoxic pulmonary vasoconstriction is mediated by increased production of reactive oxygen species. *J Appl Physiol* 2006;101:993-5.
- [6] Williams EA, Quinlan GJ, Goldstraw P, Gothard JW, Evans TW. Postoperative lung injury and oxidative damage in patients undergoing pulmonary resection. *Eur Respir J* 1998;11:1028-30.
- [7] Jordan S, Mitchell JA, Quinlan GJ, Goldstraw P, Evans TW. The pathogenesis of lung injury following pulmonary resection. *Eur Respir J* 2000;15:790-999.
- [8] Lases EC, Duurkens VAM, Gerritsen WBM, Haas FJLM. Oxidative stress after lung resection therapy. A pilot study. *Chest* 2000;117:999-1003.
- [9] Mithos 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. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;27:379-83.
- [10] Mithos 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. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;29:591-5.
- [11] Cheng Y-L, Chan K-C, Chien C-T, Sun W-Z, Lin C-J. Oxidative stress during 1-lung ventilation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132:513-8.
- [12] Tsukioka T, Nishiyama N, Iwata T, Nagano K, Tei K, Suehiro S. Preoperative serum oxidative stress marker as a strong indicator of nodal involvement in clinical stage I lung adenocarcinoma. *Int J Clin Oncol* 2012;17:250-5.
- [13] Horváth I, Hunt J, Barnes J. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005;26:523-48.
- [14] Moloney ED, Mumby SE, Gajdoci R, Cranshaw JH, Kharitonow SA, Quinlan GJ et al. Exhaled breath condensate detects markers of pulmonary inflammation after cardiothoracic surgery. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:64-9.
- [15] Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F 2 -like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9383-7.
- [16] Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:1067-82.
- [17] Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:662-80.
- [18] Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F 2 -isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995;332:1198-203.
- [19] Roca O, Gomez-Ollés S, Cruz MJ, Muñoz X, Griffiths MJ, Masclans JR. Mechanical ventilation induces changes in exhaled breath condensate of patients without lung injury. *Respir Med* 2010;104:822-8.
- [20] Liu JQ, Folz RJ. Extracellular superoxide enhances 5-HT-induced murine pulmonary artery vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L1111-8.
- [21] Keegan A, Morecroft I, Smillie D, Hicks MN, MacLean MR. Contribution of the 5-HT (1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT (1B)-receptor knockout mice and the 5-HT (1B/1D)-receptor antagonist GR127935. *Cir Res* 2001;89:1231-9.
- [22] Li C, Xu M, Wu Y, Li YS, Huang WQ, Liu KK. Limb remote ischemic preconditioning attenuates lung injury after pulmonary resection under propofol-remifentanyl anesthesia. A randomized controlled study. *Anesthesiology* 2014;121:249-59.
- [23] Kozián A, Schilling T, Fredén F, Maripuu E, Röcken C, Strang C et al. One-lung ventilation induces hyperperfusion and alveolar damage in the ventilated lung: an experimental study. *Br J Anaesth* 2008;100:549-59.
- [24] Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004;61:461-70.
- [25] 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;130:73-8.

ANEXO 2:



European Journal of Cardio-Thoracic Surgery



<http://ejcts.oxfordjournals.org/>
indexed in: MEDLINE/PubMed



European Association for Cardio-Thoracic Surgery
European Society of Thoracic Surgeons

Subscriptions

A subscription to *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* comprises 12 issues. Prices include dispatch by Standard Air. Airmail rates are available on request. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery Advance Access* contains papers that have recently been accepted but have not yet been included within an issue. Advance Access is updated daily. Annual subscription rates (Volume 47/48, 12 issues, 2015) are as follows:

Corporate	Institutional
Print and online access: £852/\$1422/€1277	Print and online access: £681/\$1137/€1022
Print edition only: £783/\$1308/€1175	Print edition only: £627/\$1047/€940
Site-wide online access only: £678/\$1132/€1017	Site-wide online access only: £542/\$906/€814
	Personal
	Print: £279/\$466/€418

Note: UK£ rate applies to UK and Rest of World, except US and Canada (US\$) and Europe (Eur€). There are other subscription rates available; for a complete listing, please visit www.ejcts.oxfordjournals.org/subscriptions.

Full prepayment in the correct currency is required for all orders. Payment should be in US dollars for orders being delivered to the USA or Canada; Euros for orders being delivered within Europe (excluding the UK); GBP Sterling for orders being delivered elsewhere (i.e. not being delivered to USA, Canada, or Europe). All orders should be accompanied by full payment and sent to your nearest Oxford Journals office. Subscriptions are accepted for complete volumes only. Orders are regarded as firm, and payments are not refundable. Our prices include dispatch by Standard Air. Claims must be notified within four months of dispatch/order date (whichever is later). Subscriptions in the EEC may be subject to European VAT. If registered, please supply details to avoid unnecessary charges. For subscriptions that include online versions, a proportion of the subscription price may be subject to UK VAT. Subscribers in Canada, please add GST to the prices quoted. Personal rate subscriptions are only available if payment is made by personal cheque or credit card, delivery is to a private address, and is for personal use only.

The current year and two previous years' issues are available from Oxford University Press. Previous volumes can be obtained from the Periodicals Service Company, 11 Main Street, Germantown, NY 12526, USA. E-mail: psc@periodicals.com. Tel: (518) 537-4700. Fax: (518) 537-5899.

Contact information

Journals Customer Service Department, Oxford Journals, Great Clarendon Street, Oxford OX2 6DP, UK. E-mail: jnlcust.serv@oup.com. Tel: +44 (0)1865 353907. Fax: +44 (0)1865 353485. **In the Americas, please contact:** Journals Customer Service Department, Oxford Journals, 2001 Evans Road, Cary, NC 27513, USA. E-mail: jlordens@oup.com. Tel: (800) 852-7323 (toll-free in USA/Canada) or (919) 677-0977. Fax: (919) 677-1714. **In Japan, please contact:** Journals Customer Service Department, Oxford Journals, 4-5-10-8F Shiba, Minato-ku, Tokyo 108-8386, Japan. E-mail: custserv.jp@oup.com. Tel: (81) 3 5444 5858. Fax: (81) 3 3454 2929.

Methods of payment

Payment should be made: by cheque (to Oxford Journals, Cashiers Office, Great Clarendon Street, Oxford, OX2 6DP, UK); by bank transfer (to Barclays Bank Plc, Oxford Office, Oxford (bank sort code 20-65-18) (UK); overseas only Swift code BARCGB22 (GB£ Sterling Account no. 70299332, IBAN GB89BARC20651870299332; US\$ Dollars Account no. 66014600, IBAN GB27BARC20651866014600; EUR EURO Account no. 78923655, IBAN GB16BARC20651878923655); or by credit card (Mastercard, Visa, Switch or American Express).

Postal information

European Journal of Cardio-Thoracic Surgery (ISSN: 1010-7940) is published monthly by Oxford University Press on behalf of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* is air-freighted and mailed in the USA by Air Business Ltd, c/o Worldnet Shipping Inc, 156-15, 146th Avenue, 2nd Floor, Jamaica, NY 11434, USA. Periodicals postage paid at Jamaica NY 11431. US Postmaster: Send address changes to *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, Air Business Ltd, c/o Worldnet Shipping Inc, 156-15, 146th Avenue, 2nd Floor, Jamaica, NY 11434, USA. Air Business Ltd is acting as our mailing agent.

Environmental and ethical policies

Oxford Journals, a division of Oxford University Press, is committed to working with the global community to bring the highest quality research to the widest possible audience. Oxford Journals will protect the environment by implementing environmentally friendly policies and practices wherever possible. Please see <http://www.oxfordjournals.org/ethicalpolicies.html> for further information on environmental and ethical policies.

Digital object identifiers

For information on DOIs and to resolve them, please visit www.doi.org.

Permissions

For information on how to request permissions to reproduce articles or information from this journal, please visit www.oxfordjournals.org/permissions.

Advertising

Advertising, inserts, and artwork enquiries should be addressed to Advertising and Special Sales, Oxford Journals, Oxford University Press, Great Clarendon Street, Oxford, OX2 6DP, UK. Tel: +44 (0)1865 354767; Fax: +44 (0)1865 353774; E-mail: jnladvertising@oup.com.

Material disclaimer

Statements of fact and opinion expressed in the *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* are those of the authors and contributors, and do not necessarily reflect those of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery, the editors, the editorial board, Oxford University Press or the organization to which the authors are affiliated. The European Association for Cardio-Thoracic Surgery, the editors, the editorial board, Oxford University Press or the organization to which the authors are affiliated do not make any representation, express or implied, in respect of the accuracy of the material in this journal and cannot accept any legal responsibility or liability for any errors or omissions that may be made. The reader should make his/her own evaluation as to the appropriateness or otherwise of any surgical or experimental techniques described.

Drug disclaimer

The mention of trade names, commercial products or organizations, and the inclusion of advertisements in the journal does not imply endorsement by the *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, the European Association for Cardio-Thoracic Surgery, the editors, the editorial board, Oxford University Press or the organization to which the authors are affiliated. The editors and publishers have taken all reasonable precautions to verify drug names and doses, the results of experimental work and clinical findings published in the journal. The ultimate responsibility for the use and dosage of drugs mentioned in the journal and in interpretation of published material lies with the medical practitioner, and the editors and publishers cannot accept liability for damages arising from any error or omissions in the journal. Please inform the editors of any errors.

Copyright © 2015 European Association for Cardio-Thoracic Surgery

Indexing/Abstracting

All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without prior written permission of the publisher or a license permitting restricted copying issued in the UK by the Copyright Licensing Agency Ltd, 90 Tottenham Court Road, London W1P 9HE.

Instructions for Authors

Full instructions for manuscript preparation and submission can be found at: http://www.oxfordjournals.org/our_journals/ejcts/for_authors/

Printed by Bell & Bain Ltd, Glasgow, UK.

Typeset by Techset Composition India Private Limited, Chennai, India.



European Journal of Cardio-Thoracic Surgery

EDITOR-IN-CHIEF

Friedhelm Beyersdorf, *Freiburg, Germany*

PAST EDITORS

Hans G. Borst, *Hannover, Germany*

Marko I. Turina, *Zurich, Switzerland*

Ludwig K. von Segesser, *Lausanne, Switzerland*

ASSOCIATE EDITORS

Michael A. Borger, *New York, NY, USA (Thoracic Vascular)*

Thierry P. Carrel, *Berne, Switzerland (Valves)*

David J. Chambers, *London, UK (Experimental)*

John Dark, *Newcastle upon Tyne, UK (Transplantation)*

Joel Dunning, *Middlesbrough, UK (Cardiac General)*

Philippe Kolh, *Liege, Belgium (Coronary)*

Daniel Loisançe, *Paris, France (Assisted Circulation)*

Carlos Mestres, *Barcelona, Spain (Cardiac General)*

René Prêtre, *Lausanne, Switzerland (Congenital)*

Gaetano Rocco, *Naples, Italy (Thoracic General, ESTS)*

Peyman Sardari Nia, *Maastricht, Netherlands (Thoracic General)*

Alexander Wahba, *Trondheim, Norway (Perfusion)*

David J. Wheatley, *Glasgow, UK (CME)*

EDITORIAL BOARD

Johannes Albes, *Bernau-Berlin, Germany*

Ottavio R. Alfieri, *Milan, Italy*

Anelechi Anyanwu, *New York, NY, USA*

Hendrick B. Barner, *St. Louis, MO, USA*

Joseph Bavaria, *Philadelphia, PA, USA*

John R. Benfield, *Los Angeles, CA, USA*

Randolph Chitwood, *Greenville, NC, USA*

Martin Czerny, *Freiburg, Germany*

Roberto Di Bartolomeo, *Bologna, Italy*

Gebrine El Khoury, *Bruxelles, Belgium*

Tatjana Fleck, *Vienna, Austria*

Rui Haddad, *Rio de Janeiro, Brazil*

John Hammon, *Winston-Salem, NC, USA*

Joachim T. Hasse, *Freiburg, Germany*

Jianxing He, *Guangzhou, China*

Roland Hetzer, *Berlin, Germany*

Jeffrey P. Jacobs, *St. Petersburg, FL, USA*

Fabio Biscegli Jatene, *Sao Paulo, Brazil*

Tom Karl, *Brisbane, Australia*

Michael Mack, *Plano, TX, USA*

Philippe Menasché, *Paris, France*

Lorenzo Menicanti, *Milan, Italy*

Friedrich-Wilhelm Mohr, *Leipzig, Germany*

Jose L. Pomar, *Barcelona, Spain*

Shunji Sano, *Okayama, Japan*

Paul T. Sergeant, *Leuven, Belgium*

Li-Zhong Sun, *Beijing, China*

David Taggart, *Oxford, UK*

Sachin Talwar, *New Delhi, India*

Pascal Thomas, *Marseille, France*

Jarle Vaage, *Oslo, Norway*

Paul E. Van Schil, *Antwerp, Belgium*

Federico Venuta, *Rome, Italy*

Ulrich O. von Oppell, *Cardiff, UK*

Pascal Vouhé, *Paris, France*

Richard Weisel, *Toronto, Canada*

Stephen Westaby, *Oxford, UK*

ASSISTANT EDITORS

Denis Berdajs, *Lausanne, Switzerland*

Servet Bölükbas, *Wuppertal, Germany*

Hans Ulrich Burger (Statistical Consultant), *Neuenburg, Germany*

Matthew Carr (Statistical Consultant), *Manchester, UK*

Xavier D'Journo, *Marseille, France*

Claudia Heilmann, *Freiburg, Germany*

Graeme Hickey (Statistical Consultant), *Liverpool, UK*

Burkhardt Seifert (Statistical Consultant), *Zurich, Switzerland*

Matthias Siepe, *Freiburg, Germany*

Gottfried Sodeck (Statistical Consultant), *Vienna, Austria*

Managing Editor

Judy Gaillard, *Freiburg, Germany*

Editorial Manager

Franziska Lüder, *Freiburg, Germany*

Editorial Office, University Freiburg - Medical Center, Department of Cardiovascular Surgery

Hugstetter Str. 55, D-79106 Freiburg, Germany.

Tel: +49-761-27090860; Fax: +49-761-27090870; E-mail: info@ejcts.org


European Journal of Cardio-Thoracic Surgery

Volume 48 No. 3 September 2015

EDITORIALS

- Joint statement on redundant (duplicate) publication by the Editors of the undersigned cardio-thoracic journals 343
Systolic anterior motion after mitral valve repair: where do we stand in 2015?
O. Alfieri and E. Lapenna 344


REVIEW

-  Outcomes of mitral valve repair compared with replacement in patients undergoing concomitant aortic valve surgery: a meta-analysis of observational studies
A. Saurav, V.M. Alla, M. Kaushik, C.C. Hunter, and A.V. Mooss 347


ADULT CARDIAC


- Multicentre double-blind randomized controlled trial of perhexiline as a metabolic modulator to augment myocardial protection in patients with left ventricular hypertrophy undergoing cardiac surgery
E.L. Senanayake, N.J. Howell, A.M. Ranasinghe, N.E. Drury, N. Freemantle, M. Frenneaux, T. Oelofse, D. Green, I.C. Wilson, S.J. Rooney, J. Mascaro, T.R. Graham, S. Bhudia, M. Lewis, and D. Pagano 354
- Do transvalvular pacemaker leads influence functional outcome after tricuspid ring annuloplasty?
T. Ratschiller, T. Guenther, C. Knappich, R. Guenzinger, V. Kehl, B. Voss, and R. Lange 363
- Morphological and functional consequences of transradial coronary angiography on the radial artery: implications for its use as a bypass conduit
M. Gaudino, A. Leone, A. Lupascu, A. Toesca, A. Mazza, F.R. Ponziani, R. Flore, P. Tondi, and M. Massetti 370


EXPERIMENTAL

- The effects of age and resveratrol on the hypoxic preconditioning protection against hypoxia-reperfusion injury: studies in rat hearts and human cardiomyocytes
H. Zheng, H. Guo, Y. Hong, F. Zheng, and J. Wang 375
- Myocardial preconditioning reduces kidney injury and apoptosis induced by myocardial ischaemia and reperfusion
C.-H. Huang, C.-C. Lai, A.-H. Yang, and S.-C. Chiang 382
-  Osteopontin alters endothelial and valvular interstitial cell behaviour in calcific aortic valve stenosis through HMGB1 regulation
M. Passmore, M. Nataatmadja, Y.L. Fung, B. Pearce, S. Gabriel, P. Tesar, and J.F. Fraser e20
- Differences in xenoreactive immune response and patterns of calcification of porcine and bovine tissues in α -Gal knock-out and wild-type mouse implantation models
M.-S. Kim, S. Jeong, H.-G. Lim, and Y.J. Kim 392

TX & MCS

- Evaluation of late aortic insufficiency with continuous flow left ventricular assist device
A. Hiraoka, J.E. Cohen, Y. Shudo, J.W. MacArthur Jr, J.L. Howard, A.S. Fairman, P. Atluri, J.N. Kirkpatrick, and Y.J. Woo 400
-  A difficult decision: what should we do when malignant tumours are diagnosed in patients supported by left ventricular assist devices?
H. Smail, C. Pfister, J.-M. Baste, C. Nafeh-Bizet, A. Gay, V. Barbay, J.-P. Bessou, C. Peillon, and P.-Y. Litzler e30

 CME Quiz available at <http://www.ejctscme.org>

 Online-only articles and videos are accessible to journal subscribers at <http://ejcts.oxfordjournals.org/>

Myocardial fibrosis and pro-fibrotic markers in end-stage heart failure patients during continuous-flow left ventricular assist device support	
<i>S.I. Lok, F.M.A. Nous, J. van Kuik, P. van der Weide, B. Winkens, H. Kemperman, A. Hulsmans, J.R. Lahpor, R.A. de Weger, and N. de Jonge</i>	407
Neuron-specific enolase correlates to laboratory markers of haemolysis in patients on long-term circulatory support	
<i>U. Geisen, C. Benk, F. Beyersdorf, R. Klemm, G. Trummer, B. Özbek, F. Kern, and C. Heilmann</i>	416
Platelet dysfunction and acquired von Willebrand syndrome in patients with left ventricular assist devices	
<i>M. Baghai, C. Heilmann, F. Beyersdorf, L. Nakamura, U. Geisen, M. Olschewski, and B. Zieger</i>	421

THORACIC


Preventive analgesia in thoracic surgery: controlled, randomized, double-blinded study	
<i>M. Nosotti, L. Rosso, D. Tosi, A. Palleschi, P. Mendogni, I. Righi, C. Marengi, and L. Santambrogio</i>	428
Pneumonectomy for benign disease: indications and postoperative outcomes, a nationwide study	
<i>C. Rivera, A. Arame, C. Pricopi, M. Riquet, G. Mangiameli, M. Abdennadher, M. Dahan, and F. Le Pimpec Barthes</i>	435
Prognostic model of survival for typical bronchial carcinoid tumours: analysis of 1109 patients on behalf of the European Association of Thoracic Surgeons (ESTS) Neuroendocrine Tumours Working Group	
<i>P.L. Filosso, F. Guerrero, A. Evangelista, S. Welter, P. Thomas, P.M. Casado, E.A. Rendina, F. Venuta, L. Ampollini, A. Brunelli, F. Stella, M. Nosotti, F. Ravaglia, V. Larocca, O. Rena, S. Margaritora, F. Ardisson, W.D. Travis, I. Sarkaria, and D. Sagan, the ESTS NETs-WG Steering Committee</i>	441
Extended transcervical thymectomy with partial upper sternotomy: results in non-thymomatous patients with myasthenia gravis	
<i>E. Ruffini, F. Guerrero, P.L. Filosso, G. Bora, G. Nex, S. Gusmano, M.L. Giobbe, G. Ciccone, M.C. Bruna, R. Giobbe, P. Solidoro, P. Lyberis, and A. Oliaro</i>	448
Clinical predictors of early cancer-related mortality following neoadjuvant therapy and oesophagectomy	
<i>B.M. Stiles, G.G. Salzler, A. Nasar, S. Paul, P.C. Lee, J.L. Port, and N.K. Altorki</i>	455
Editorial comment by B. Kidane and G.E. Darling	461
Oxidative lung injury correlates with one-lung ventilation time during pulmonary lobectomy: a study of exhaled breath condensate and blood	
<i>J. García-de-la-Asunción, E. García-del-Olmo, J. Pérez-Griera, F. Martí, G. Galan, A. Marcolla, R. Wins, R. Gujjarro, A. Arnau, B. Sarriá, M. García-Raimundo, and J. Belda</i>	e37
Unilateral chronic lung allograft dysfunction is a characteristic of bilateral living-donor lobar lung transplantation	
<i>E. Miyamoto, F. Chen, A. Aoyama, M. Sato, T. Yamada, and H. Date</i>	463


CONGENITAL

Feasibility and related outcome of intraluminal pulmonary artery banding	
<i>S. Sandrio, A. Purbojo, F. Arndt, O. Toka, M. Glöckler, S. Dittrich, R. Cesnjevar, and A. Ruffer</i>	470
Editorial comment by A.J. Parry	481
Outcomes after aortic arch reconstruction for infants: deep hypothermic circulatory arrest versus moderate hypothermia with selective antegrade cerebral perfusion	
<i>I.A. Kornilov, Y.S. Sinelnikov, I.A. Soinov, D.N. Ponomarev, M.S. Kshanovskaya, A.A. Krivoshapkina, A.V. Gorbatykh, and A.Y. Omelchenko</i>	e45

AORTIC SURGERY

Long-term outcomes after aortic arch surgery: results of a study involving 623 patients	
<i>M. Di Eusanio, P. Beretta, M. Cefarelli, S. Castrovinci, G. Folesani, J. Alfonsi, A. Pantaleo, G. Murana, and R. Di Bartolomeo</i>	483
Impact of surgical experience on outcome in surgery of acute type A aortic dissection	
<i>A. Lenos, P. Bougioukakis, V. Irimie, M. Zacher, A. Diegeler, and P.P. Urbanski</i>	491
Editorial comment by J. Bachet and T. Carrel	497

 CME Quiz available at <http://www.ejctscme.org>

 Online-only articles and videos are accessible to journal subscribers at <http://ejcts.oxfordjournals.org/>

SURGICAL TECHNIQUE

- ✦ Use of self-expanding venous cannula in tricuspid reoperation
M. Piñón, G. Pradas, D. Molina, and J.J. Legarra 499
- e✦ Transatrial left-ventricular cannulation in acute aortic dissection type A: a novel cannulation technique
F. Schoeneich, A. Rahimi-Barfeh, C. Grothusen, and J. Cremer e51

CASE REPORTS


- e Oki stenting for anastomotic bronchomalacia in lung transplantation
D. López-Padilla, R. García-Luján, A. de Pablo, and E. de Miguel Poch e53
- e Oesophageal cancer with an aberrant right subclavian artery accompanied by a thoracic duct anomaly
S. Oya, S. Mine, M. Watanabe, and K. Yamada e55
- Histology of a Marfan aorta 4.5 years after personalized external aortic root support
J. Pepper, M. Goddard, R. Mohiaddin, and T. Treasure 502
- Editorial comment by D. Pacini 505
- Anatomical aortic reconstruction in Marfan disease: dismantling of a hybrid repair
E. Quintana, C. Bruce, A. Sabate Rotes, and A. Pochettino 507

IMAGES IN CARDIO-THORACIC SURGERY

- e High-frequency epicardial ultrasound for the intraoperative assessment of coronary in-stent stenosis
H. El-Basheir and H. Parisis e58
- Incidental aortic valve myxoma: tumour excision and aortic valve repair
G. Laguna, Y. Carrascal, N. Arce, and G. Martínez 510
- e✦ Supramitral membrane mimicking posterior mitral valve prolapse
C. Branco, G.F. Coutinho, and M.J. Antunes e60
- 41 Years after Björk-Shiley valve implantation: advanced preparation of a giant root pseudoaneurysm entrapping the right coronary artery
A. Zientara, A. Häussler, M. Genoni, and O. Dzembali 512
- e Severe right coronary artery injury during minimally invasive tricuspid valve repair
M. Vollroth, M. Sandri, J. Garbade, and F.W. Mohr e62
- Pulmonary sequestration mimicking a hydatid cyst
Y. Aydın, H. Ogul, B. Altuntas, and A. Eroglu 514
- e Late surgical retrieval of a nitinol occluder system embolized in the aortic arch
A. Gallo, S. Cisico, B. Reimers, and S. Saccà e63

LETTERS TO THE EDITOR

- Minimally invasive Cox-maze procedure, beating-heart epicardial ablation, hybrid procedure and catheter ablation: a call for comparative evidence
K. Phan and T.D. Yan 515
- Reply to Phan and Yan
N. Ad 515
- Could the grade of the tumour be related to nodal involvement?
S. Cubuk and O. Yucel 516
- Reply to Cubuk and Yucel
A. Hattori, K. Suzuki, K. Takamochi, and S. Oh 516
- Is limited surgery recommended if nodal involvement cannot be ruled out?
A. Baisi, F. Raveglia, M. De Simone, and U. Cioffi 517
- Reply to Baisi et al.
A. Hattori, K. Suzuki, K. Takamochi, and S. Oh 517

 CME Quiz available at <http://www.ejctscme.org>

e✦ Online-only articles and videos are accessible to journal subscribers at <http://ejcts.oxfordjournals.org/>

Glutathione oxidation correlates with one-lung ventilation time and PO₂/FiO₂ ratio during pulmonary lobectomy

José García-de-la-Asunción¹, Eva García-del-Olmo², Genaro Galan³, Ricardo Guijarro², Francisco Martí¹, Rafael Badenes¹, Jaume Perez-Griera⁴, Alejandro Duca¹, Carlos Delgado¹, Jose Carbonell¹, and Javier Belda¹

¹Department of Anesthesiology and Critical Care, Hospital Clínico Universitario de Valencia. Instituto de Investigación Sanitaria (INCLIVA), Spain, ²Department of Thoracic Surgery, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Spain, ³Department of Thoracic Surgery, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Spain, ⁴Laboratory of Biochemistry, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Spain

Objectives: During lung lobectomy, the operated lung completely collapses with simultaneous hypoxic pulmonary vasoconstriction, followed by expansion and reperfusion. Here, we investigated glutathione oxidation and lipoperoxidation in patients undergoing lung lobectomy, during one-lung ventilation (OLV) and after resuming two-lung ventilation (TLV), and examined the relationship with OLV duration.

Methods: We performed a single-centre, observational, prospective study in 32 patients undergoing lung lobectomy. Blood samples were collected at five time-points: T0, pre-operatively; T1, during OLV, 5 minutes before resuming TLV; and T2, T3, and T4, respectively, 5, 60, and 180 minutes after resuming TLV. Samples were tested for reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), glutathione redox potential, and malondialdehyde (MDA).

Results: GSSG and MDA blood levels increased at T1, and increased further at T2. OLV duration directly correlated with marker levels at T1 and T2. Blood levels of GSH and glutathione redox potential decreased at T1–T3. GSSG, oxidized glutathione/total glutathione ratio, and MDA levels were inversely correlated with arterial blood PO₂/FiO₂ at T1 and T2.

Discussion: During lung lobectomy and OLV, glutathione oxidation, and lipoperoxidation marker blood levels increase, with further increases after resuming TLV. Oxidative stress degree was directly correlated with OLV duration, and inversely correlated with arterial blood PO₂/FiO₂.

Keywords: Lung lobectomy, One-lung ventilation, Oxidative lung injury, Glutathione oxidation, Glutathione redox potential, Malondialdehyde

Introduction

During pulmonary lobectomy, one-lung ventilation (OLV) is applied because the operated lung is completely collapsed, hypoperfused, and suffers reactive hypoxic pulmonary vasoconstriction in response to alveolar hypoxia.^{1,2} Moreover, the hypoxic tissues increase reactive oxygen species (ROS) production in the mitochondria respiratory chain,^{3,4} contributing to increasing vasoconstriction.⁵ Altogether, patients undergoing lobar lung resection suffer relative ischaemia during lung collapse, followed by expansion-reperfusion and oxidative injury attributed to

ROS.^{6,7} However, few studies have examined this sequence of events. Increased urinary malondialdehyde (MDA) levels are reported in patients following pulmonary resection, and studies show increased blood MDA levels after lung resection and resuming two-lung ventilation (TLV), with massive superoxide production associated with lung re-expansion and reoxygenation.^{8–11} To date, no studies have investigated the time-course of blood glutathione (GSH) oxidation in patients undergoing lung lobectomy or its relationship with lung collapse duration.

GSH is the predominant low-molecular-weight thiol in animal cells. It originates primarily from the liver and is mainly detected in the cytosol at concentrations ranging from 0.1 to 10 mM, with the highest levels reported in the liver, spleen, kidney, lens, erythrocytes, and leukocytes.¹² Plasma concentrations of reduced GSH are relatively low (2–20 μmol/l)

Correspondence to: José García de la Asunción, Department of Anesthesiology and Critical Care, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Fundación Investigación Clínica de Valencia-INCLIVA, Av. Blasco Ibañez 17, 46010 Valencia, Spain.
Email: josegarciaadelaasuncion@gmail.com
This article was originally published with errors. This version has been corrected. Please see Erratum (<http://dx.doi.org/10.1080/13510002.2016.1202057>).

because the cysteine residue is readily oxidized by free radicals and reactive oxygen/nitrogen species to form glutathione disulphide (GSSG). GSH is involved in antioxidant defence and several other cellular functions. The GSSG/2GSH system is the most important cellular redox coupling, playing crucial roles in antioxidant protection.¹² Blood glutathione levels may reflect the glutathione status throughout the body, including in other less accessible tissues. Thus, measurements of GSH and GSSG in whole blood are considered an index of oxidative injury and a potential indication of disease.^{12–15}

Lipid peroxidation in cell membranes can be defined as the oxidative deterioration of lipids containing carbon-carbon double bonds. A large number of metabolites are formed, including many electrophiles that react with protein and DNA. The aldehyde MDA is the principal and most studied product of polyunsaturated fatty acid peroxidation. MDA is a highly toxic molecule that contributes to reperfusion damage.^{9,10,16,17}

The present study aimed to investigate the time-course of glutathione oxidation and lipid peroxidation in blood from patients undergoing lung lobectomy, during OLV and after resuming TLV. We also examined the correlation between OLV duration and oxidative stress marker levels. Finally, we studied the relationship between glutathione oxidation and arterial blood PO_2/FiO_2 values immediately before and after resuming TLV, as a marker of poor oxygenation of the operated lung and hypoxaemia before and after OLV.

Material and methods

Study subjects

This prospective observational study included 32 lung cancer patients (27 men and 5 women) with non-small cell lung cancer who were scheduled for elective lung lobectomy at a single centre. Exclusion criteria included previous radiotherapy or chemotherapy, oral antioxidant vitamin use, active systemic infection, body temperature above 38°C, pregnancy, drug addiction, malnutrition, or body weight loss of >20% in the last 2 months. Each patient gave informed consent, and the study protocol was approved by the Ethics Committee at Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Anaesthetics details

Anaesthesia was induced intravenously using sodium thiopental (3–5 mg/kg) and fentanyl (2 µg/kg). Tracheal intubation was performed with a double-lumen tube and using rocuronium bromide (0.6 mg/kg). Anaesthesia was maintained with sevoflurane inhalation. During anaesthesia, we monitored arterial

oxygen saturation, invasive blood pressure in the radial artery, heart rate, and end-tidal CO_2 .

TLV was performed in a volume-controlled mode with a tidal volume of 7–8 ml/kg ideal body weight, using a respiratory rate of 12–14 breaths/min a 1:2 I:E ratio. Once the operated lung was collapsed and the thorax was opened to air, OLV was performed with a tidal volume of 5–6 ml/kg ideal body weight, a 14–18 breaths/min respiratory rate, and a 1:2 I:E ratio, maintaining an end-tidal CO_2 of <40 mmHg. To keep O_2 saturation >92% during TLV and OLV, we used a positive end-expiratory pressure (PEEP) of 5–7 cm H_2O and a 50% fraction of inspired oxygen (FiO_2 0.5). FiO_2 was increased momentarily if O_2 saturation decreased to <92% and not efficacy of recruitment manoeuvres to the ventilated lung. For post-operative pain management, a thoracic epidural catheter was inserted. After surgery, all patients were transferred to the care unit for at least 24 hours.

Blood sampling

From each patient, five arterial blood samples were collected from a radial artery line at specific time-points: T0, pre-operatively; T1, during OLV, 5 minutes before resuming TLV; and T2, T3, and T4, respectively, 5, 60, and 180 minutes after resuming TLV. An ABL 88 Flex apparatus (Radiometer, Denmark) was used to analyse the following arterial blood gas parameters: pH, partial oxygen pressure (PaO_2), PaO_2/FiO_2 ratio, and partial carbon dioxide pressure ($PaCO_2$).

Determination of oxidative stress markers levels in blood

To analyse GSSG in the presence of a large excess of GSH, proteins were precipitated from arterial whole blood samples (0.5 ml) using 0.5 ml ice-cold perchloric acid (12%) containing 20 mM of the GSH quenching agent *N*-ethylmaleimide (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) to prevent GSH oxidation during sample preparation, and 1 mM of the metal chelator bathophenanthroline disulfonic acid (Sigma Chemical Co.). Samples were then centrifuged at 15 000 g for 5 minutes at 4°C. The acidic supernatants were stored frozen at –20°C until derivatization, and were then used to determine GSSG levels using high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV-visible detection (365 nm).¹⁸

To analyse GSH, arterial whole blood samples (0.5 ml) were added to 0.5 ml ice-cold 30% trichloroacetic acid containing 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid. Samples were then centrifuged at 15 000 g for 5 minutes at 4°C, and the acidic supernatant was stored at –20°C until analysis. GSH was measured using the glutathione-*S*-transferase (GST) assay, based on the GST-catalysed reaction between chlorodinitrobenzene

and GSH in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7), which was spectrophotometrically detected at 340 nm.¹⁹ The oxidized glutathione/total glutathione ratio was calculated as $[2\text{GSSG}/(\text{GSH} + 2\text{GSSG})] \times 100$ and expressed as a percentage that indicates the glutathione redox status and is an oxidative stress index.

To analyse MDA, arterial whole blood samples (1 ml) were collected from a radial artery line into BD Vacutainer LH PST II tubes with lithium heparin (Plymouth, UK). Samples were centrifuged at 3000g for 12 minutes, and the separated plasma was stored at -80°C until analysis. Lipid peroxides were hydrolysed by boiling in diluted phosphoric acid. Then MDA was reacted with thiobarbituric acid to form the MDA(TBA)₂ adduct, which was detected by HPLC and quantified with UV light at 532 nm.²⁰

Calculation of redox potential

To calculate the redox state of the GSSG–GSH couple, we used the Nernst equation: $E_h = E_0 + RT/nF \ln[\text{disulphide}]/[\text{thio}]^2$, where E_0 is the standard potential for the redox couple, R is the gas constant, T is the absolute temperature, n is 2 for the number of electrons transferred, and F is Faraday's constant. To calculate the redox potential in whole blood, we used the equation $E_h \text{ (mV)} = E_0 + 30 \log ([\text{GSSG}]/[\text{GSH}]^2)$ at 37°C (310 K), where the standard potential E_0 is -264 mV at pH 7.4 (-5.9 mV for every 0.1 increase in pH), E_0 at pH 7.0 is -240 , and the concentrations are in moles/liter.^{21,22}

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SD. Data were parametric and normally distributed. One-way analysis of variance for repeated measures (T1–T4 vs. T0) was performed to assess the effects of OLV time and subsequent lung re-expansion on blood levels of glutathione oxidation and lipid peroxidation markers. Then, the data sets in which F was significant were examined by the t -test, using $P < 0.05$ as the critical limit. Pearson's correlation coefficient (r) was calculated to analyse how total lung collapse duration correlated with blood levels of oxidative stress markers and redox potential or with the $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio. Analyses were performed using SPSS version 11.0 (Chicago, IL, USA). Excel (Microsoft Office 2011, Redmond, WA, USA) was used for graphics.

Results

Table 1 summarizes pre-operative parameters and clinical data during surgery. Seven patients intermittently required $>50\%$ oxygen during OLV to maintain

O_2 saturation of $>92\%$. No patients had difficulty maintaining lung isolation during surgery. In five patients, the $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio in arterial blood gas was <200 between the first 24 hours of admission to in the post-operative care unit (mean for all patients, 250 ± 54).

Table 2 summarizes the arterial blood gas parameters at five time-points. Comparing T1–T4 values to T0 values revealed a significant decrease of pH at T2 (5 minutes after resuming TLV; $P = 0.041$). At T1 (during OLV, 5 minutes before resuming TLV), we observed a significant increase in PaCO_2 ($P < 0.001$). PaO_2 values decreased at T1 ($P < 0.001$), T2 ($P < 0.01$), T3 ($P < 0.01$), and T4 ($P < 0.001$). Thus, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ also significantly decreased at T1 ($P < 0.001$), T2 ($P < 0.01$), T3 ($P < 0.05$), and T4 ($P < 0.01$).

Figure 1 summarizes the time course of oxidative stress marker levels in arterial blood from T0 to T4. The main cellular antioxidant GSH decreased significantly during time-points T1 ($P < 0.01$), T2 ($P < 0.001$), and T3 ($P < 0.01$) (Fig. 1(A)). In contrast, blood GSSG levels significantly increased at T1 ($P < 0.001$), T2 ($P < 0.001$), T3 ($P < 0.001$), and T4 ($P < 0.01$) (Fig. 1(B)), with a particular increase at T2 due to strong GSH oxidation during lung re-expansion. The blood oxidized glutathione/total glutathione ratio was also increased at T1 ($P < 0.001$), T2 ($P < 0.001$), and T3 ($P < 0.001$) (Fig. 1(C)), which represents the systemic redox status. MDA, an end-product of cellular phospholipids peroxidation, also increased at T1 ($P < 0.01$), T2 ($P < 0.001$), T3 ($P < 0.01$), and T4 ($P < 0.05$) – most intensely at T2 due to lung re-expansion (Fig. 1(D)).

Table 3 presents the time-course of redox potentials for the GSSH–GSH couple in whole blood. Compared

Table 1 Demographic and clinical data (n = 32)

Age (years)	65.6 \pm 10.0
Sex (M/F), n	27/5
BMI (kg/m ²)	25.8 \pm 4.3
Current smokers, n	10
Ex-smokers, n	19
Never smoked, n	3
Pre-operative FEV ₁ (l)	2.05 \pm 0.53
Side (right/left), n	20/12
Histology, n	
Adenocarcinoma	13
Squamous carcinoma	18
Other	1
OLV time (min)	111 \pm 38
Surgery duration (min)	150 \pm 37
Intraoperative fluid load (l)	1.28 \pm 0.30
Intraoperative urine (l)	0.60 \pm 0.38
Average mean arterial pressure (mmHg)	78 \pm 9
Average heart rate (beats/min)	84 \pm 16
Average temperature ($^{\circ}\text{C}$)	35.7 \pm 0.6

Values expressed as mean \pm SD unless otherwise noted. BMI, body mass index; FEV₁, forced expiratory volume in 1 second; OLV, one-lung ventilation.

Table 2 Arterial blood gas parameters during lung lobectomy (n = 32)

Time-points	T0	T1	T2	T3	T4
pH	7.373 ± 0.034	7.359 ± 0.026	7.356 ± 0.033*	7.373 ± 0.027	7.368 ± 0.042
PaCO ₂	36.5 ± 3.2	39.2 ± 2.3***	37.7 ± 2.7	37.3 ± 1.6	36.9 ± 3.3
PaO ₂	171 ± 30	134 ± 30***	147 ± 33**	145 ± 31**	146 ± 25***
PaO ₂ /FI _O ₂	333 ± 68	243 ± 76***	278 ± 71**	290 ± 62*	291 ± 50**

Values expressed as mean ± SD. Differences T1–T4 vs. T0 were analysed with two-tailed Student's *t*-test. PaO₂ (mmHg), oxygen partial pressure; PaCO₂ (mmHg), carbon dioxide partial pressure; FI_O₂, fraction of inspired oxygen. **P* < 0.05. ***P* < 0.01. ****P* < 0.001.

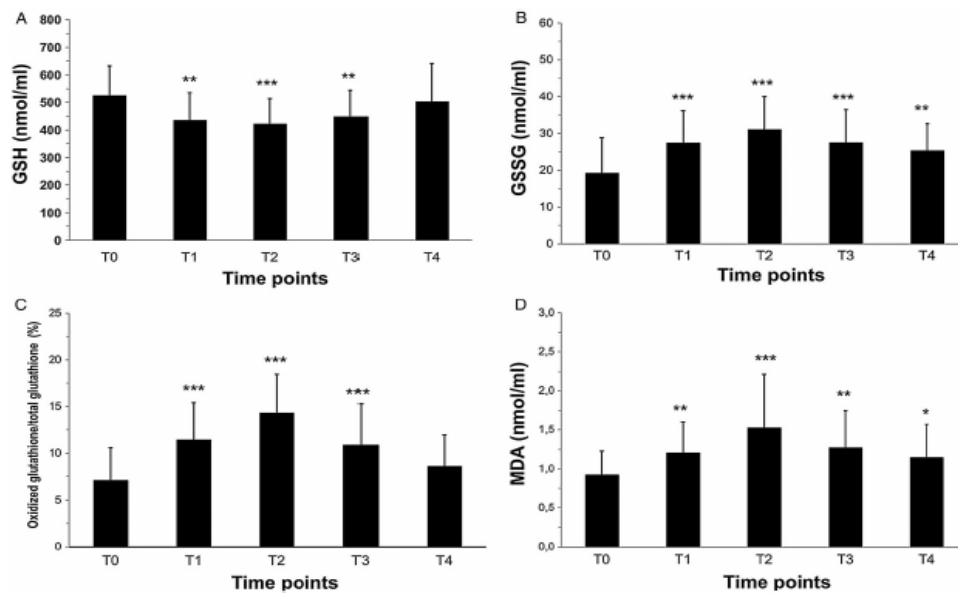


Figure 1 Time-course of glutathione oxidation and lipid peroxidation marker levels in arterial blood. (A) Reduced glutathione (GSH). (B) Oxidized glutathione (GSSG). (C) Oxidized glutathione/total glutathione ratio [(2GSSG/(GSH + 2GSSG))*100]. (D) Malondialdehyde (MDA). T0, pre-operatively; T1, 5 minutes before resuming two-lung ventilation (TLV); T2, 5 minutes after resuming TLV; T3, 60 minutes after resuming TLV; T4, 180 minutes after resuming TLV. Values are expressed as mean ± SD (n = 32). Differences between T0 and T1–T4 were analysed using a two-tailed Student's *t*-test. **P* < 0.05; *P* < 0.01; ****P* < 0.001.**

Table 3 Redox potential of the GSSG/2GSH couple, and the correlations with lung collapse time and PaO₂/FI_O₂ ratio during lung lobectomy

Time-points	T0	T1	T2	T3	T4
<i>E_h</i> (mV)	-209 ± 7.6	-199 ± 7.1 <i>P</i> < 0.0001	-197 ± 8.0 <i>P</i> < 0.0001	-200 ± 8.3 <i>P</i> < 0.0001	-203 ± 8.0 <i>P</i> = 0.0018
<i>r_{min}</i>	-0.0145 <i>P</i> = 0.9362	-0.3504 <i>P</i> = 0.0456	-0.4888 <i>P</i> = 0.0039	-0.3811 <i>P</i> = 0.0287	-0.0538 <i>P</i> = 0.7662
<i>r_{p/F}</i>	-0.0273 <i>P</i> = 0.8803	0.3627 <i>P</i> = 0.0380	0.2989 <i>P</i> = 0.0911	0.0094 <i>P</i> = 0.9586	0.4034 <i>P</i> = 0.0199

Values expressed as mean ± SD (n = 32). *E_h*, redox potential of GSSG/2GSH couple; *r_{min}*, Pearson's correlation coefficient between *E_h* and lung collapse time; *r_{p/F}*, Pearson's correlation coefficient between *E_h* and PaO₂/FI_O₂ values; PaO₂ (mmHg), oxygen partial pressure; FI_O₂, fraction of inspired oxygen. For *E_h*, differences of T1–T4 vs. T0 were analysed with a two-tailed Student's *t*-test. *P* values of < 0.05 were considered statistically significant.

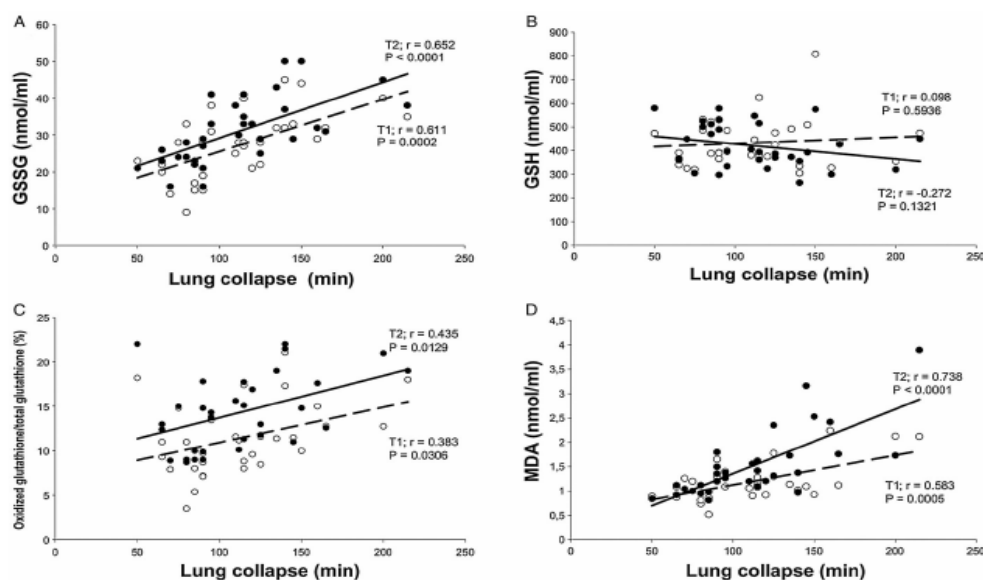


Figure 2 Pearson's correlation coefficients (r) were determined between the total duration of lung collapse (min) and the oxidative stress marker levels in the blood at time-points T1 (5 minutes before resuming two-lung ventilation) and T2 (5 minutes after resuming two-lung ventilation) ($n = 32$). (A) Oxidized glutathione (GSSG). (B) Reduced glutathione (GSH). (C) Oxidized glutathione/total glutathione ratio [$2\text{GSSG}/(\text{GSH} + 2\text{GSSG}) \times 100$]. (D) Malondialdehyde (MDA). P -values of <0.05 were considered statistically significant.

to at T0, the redox potentials at T1–T4 showed significantly increased oxidation. Redox potential was most oxidized at T2, after lung re-expansion immediately following the lobectomy, in parallel with GSH and GSSG levels (Fig. 1). Furthermore, we found a significant inverse correlation of lung collapse duration with redox potential at T1–T3, particularly at T2 ($r = -0.4888$; $P = 0.0039$). Redox potentials were also correlated with arterial blood PO_2/FiO_2 values, particularly at T1 ($r = 0.3627$; $P = 0.0380$) and T4 ($r = 0.4034$; $P = 0.0199$) (Table 3).

Total lung collapse duration was positively correlated with blood oxidized glutathione levels at T1 ($r = 0.611$; $P = 0.0002$), and this correlation was stronger at T2 ($r = 0.652$; $P = 0.0001$) (Fig. 2(A)). However, reduced glutathione levels were not correlated with OLV times (Fig. 2(B)). Oxidized glutathione/total glutathione ratio was positively correlated with OLV times at T1 ($r = 0.383$; $P = 0.0306$) and T2 ($r = 0.436$; $P = 0.0129$) (Fig. 2(C)). Lung collapse duration was also strongly significantly correlated with MDA levels at T1 ($r = 0.583$; $P = 0.0005$) and T2 ($r = 0.738$; $P = 0.0001$) (Fig. 2(D)).

Furthermore, we found that blood GSSG, oxidized glutathione/total glutathione ratio, and MDA levels were significantly inversely correlation with arterial

blood PO_2/FiO_2 values at T1 and T2 (Fig. 3(A–C)). Lung collapse duration was also inversely correlated with arterial blood PO_2/FiO_2 values, particularly at T1 (Fig. 3(D)).

Discussion

The pathological mechanisms of lung injury and oedema following pulmonary resection are considered to be related to the effects of ROS in the operated lung parenchyma, at least partly due to collapse, with hypoxic insult followed by re-oxygenation injury after lung re-expansion.^{6–11,23–25} The operated lung is totally atelectatic with only a small fraction of pulmonary blood flow passing through it. After resuming TLV, the operated lung may suffer reduced perfusion due to microatelectasis-induced vasoconstriction.²⁶

Examining arterial blood gas parameters at time-points throughout lung lobectomy revealed a reperfusion-associated pH decrease at 5 minutes after resuming TLV (T2). Moreover, PaCO_2 moderately increased due to hypoventilation at T1, 5 minutes before resuming TLV. Relative to T0, PaO_2 decreased at all time-points, particularly in T1, during operated lung collapse. $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ also decreased at T1–T4. These findings suggest a ventilation/perfusion mismatch during and after operated lung collapse.

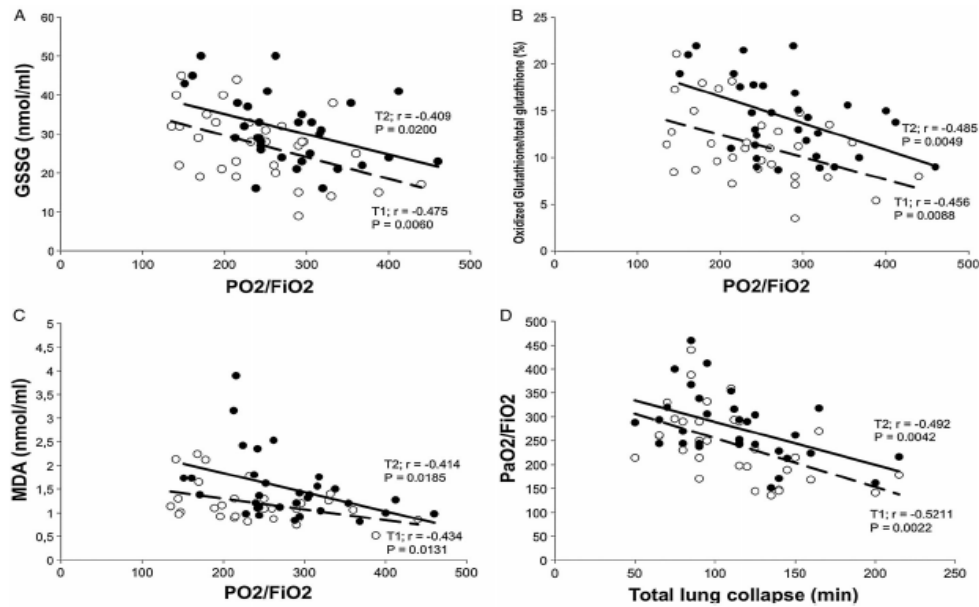


Figure 3 Pearson's correlation coefficients (r) were determined between PO_2/FiO_2 values in arterial blood and total time of lung collapse (min), and between PO_2/FiO_2 values in arterial blood and glutathione oxidation and lipid peroxidation marker levels in blood at T1 (5 minutes before resuming two-lung ventilation) and T2 (5 minutes after resuming two-lung ventilation). (A) Oxidized glutathione (GSSG). (B) Oxidized glutathione/total glutathione ratio $[(2GSSG)/(GSH + 2GSSG)] \times 100$. (C) Malondialdehyde (MDA). (D) Total time of lung collapse (min). P -values of <0.05 were considered statistically significant.

Blood levels of GSH – the main molecule involved in antioxidant defence, ROS scavenging, and removing hydrogen and lipid peroxides – were decreased during operated lung collapse and hypoperfusion. At the same time (T1), other oxidative stress marker levels increased, including GSSG, oxidized glutathione/total glutathione ratio, GSSH–GSH couple redox potential, and MDA. This finding may be explained by the paradoxical cellular generation of ROS under conditions of ischaemia or lowered oxygen, using the considerable residual O_2 present during ischaemia. In such situations, the respiratory cytochromes become redox-reduced, enabling direct electron transfer to oxygen, producing large amounts of superoxide anions. Mitochondria-generated ROS apparently function as second messengers during hypoxia, contributing to signal transduction and leading to smooth muscle cell contraction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. The concept of ischaemia-generated ROS is highly important, as it may contribute to oxidative cellular injury and play a signalling role during preconditioning.^{27–31}

All measured values showed larger increases immediately after resuming TLV by reperfusion phenomena at T2. Studies in other organs support

the notion of ROS-generated reperfusion injury upon oxygen reintroduction to ischaemic tissue.^{30,32,33} Our results provide the first evidence of significantly increased glutathione oxidation in this area, which correlates with an imbalance in the glutathione redox status (oxidized glutathione/total glutathione ratio). This suggests increased oxidative stress during and after OLV, probably due to multi-factorial causes, including lung collapse/hypoperfusion, tissue manipulation, and one-lung mechanical ventilation.

Our study showed that all oxidative injury marker blood levels were directly positively correlated with total lung collapse duration, and were always higher in T2 than T1. However, the decreased GSH levels were not correlated with OLV duration, possibly due to excessive GSH levels relative to the GSSG levels. These results are consistent with the inverse correlation between arterial blood PO_2/FiO_2 ratios and the levels of GSSG, oxidized glutathione/total glutathione ratio, and MDA before and after resuming TLV from OLV. Our findings suggest altered oxygen transport in the operated lung, which is related to diffuse alveolar damage induced at least partly by ROS and its contribution to gas exchange impairment after thoracic surgery. At T2, the whole blood GSSH–GSH couple

redox potentials showed increased oxidation levels, in parallel with whole blood GSH and GSSG levels. Moreover, total lung collapse duration was inversely correlated with arterial blood PO_2/FiO_2 , particularly at T1 (during operated lung collapse) and T4 (possibly due to impaired oxygen transport in the operated lung). Redox potential assessment is a promising tool for investigating both normal and pathological situations, including congenital mitochondrial diseases and *in vitro* studies of proliferation, differentiation, apoptosis, and cellular necrosis.^{21,22,34,35}

Importantly, our present results showed that total lung collapse duration during lobectomy was significantly correlated with glutathione oxidation and other oxidative damage marker levels. Our findings support the hypothesis of a direct relationship between OLV duration and the severity of oxidative damage during reperfusion in the expanded lung. Cancer patients undergoing lung lobectomy experience increased ROS formation, with increased glutathione oxidation and other oxidative stress marker levels in blood during OLV. These increases were larger after resuming TLV and were correlated with lung collapse and OLV duration. Furthermore, glutathione oxidation and lipid peroxidation were inversely correlated with arterial blood PO_2/FiO_2 values during and after OLV, possibly due to alveolar hypoxia and hypoxaemia before and after resuming TLV.

Acknowledgments

The authors thank Prof Dr José Viña and Prof Dr Federico Pallardó (Department of Physiology, University of Valencia) for their generous help with GSH and GSSG determination.

Disclaimer statements

Contributors J.G.D.L.A. takes responsibility for the integrity of the data. Study concept and design: J.G.D.L.A. Acquisition of data: E.G.D.O., G.G., F.M., R.B., J.P.G., A.D., C.D., J.C. Analysis and interpretation of data: J.G.D.L.A., E.G.D.O., F.M., J.P.G. Drafting of the manuscript: J.G.D.L.A., E.G.D.O. Critical revision of the manuscript: J.G.D.L.A., J.B., G.G., R.G., R.B. Statistical analysis: F.M. Administrative, technical, or material support: A.D., C.D., J.C. Study supervision: J.G.D.L.A.

Funding This work was supported in part by a grant (PI07/0836) from Instituto de Salud Carlos III to José García-de-la-Asunción.

Conflict of interest None declared.

Ethics approval The Ethic Committee at Hospital Clínico Universitario de Valencia (2006/184) approved the protocol and an informed consent was obtained from each patient.

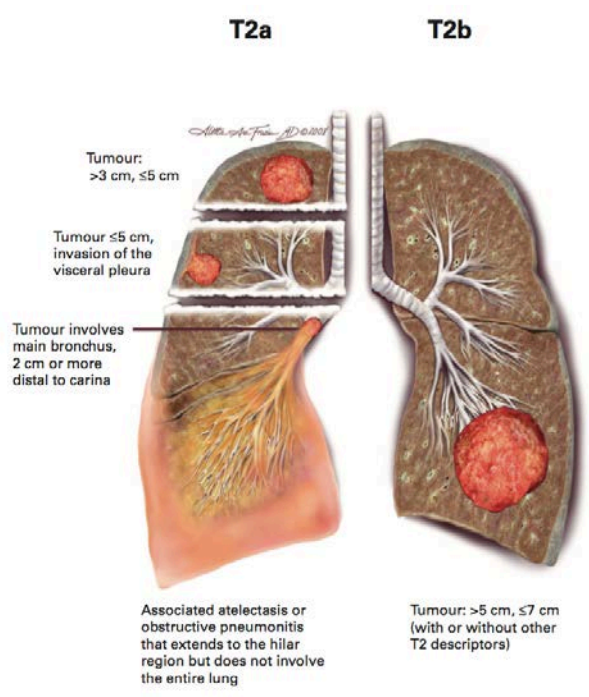
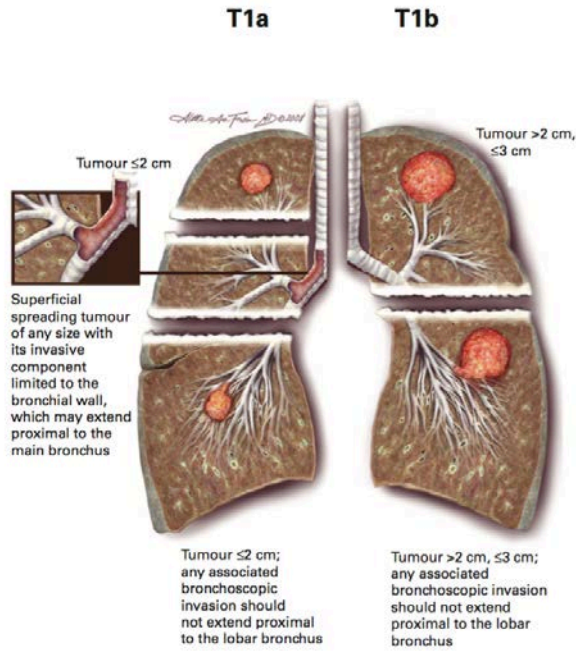
References

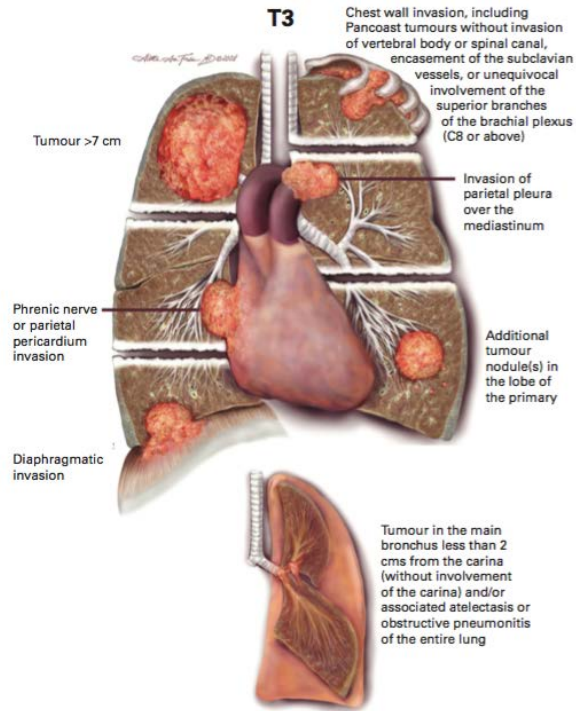
- 1 Marshall BE, Marshall C, Benumof J, Saidman LJ. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in dogs: effects of lung segment size on oxygen tension. *J Appl Physiol* 1981;51:1543-51.
- 2 Orchard CH, Sanchez de León R, Sykes MK. The relationship between hypoxic pulmonary vasoconstriction and arterial oxygen tension in the intact dog. *J Physiol* 1983;338:61-74.
- 3 Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003;278:36027-31.
- 4 St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002;277:44784-90.
- 5 Ward JPT. Point: hypoxic pulmonary vasoconstriction is mediated by increased production of reactive oxygen species. *J Appl Physiol* 2006;101:993-5.
- 6 Williams EA, Quinlan GJ, Goldstraw P, Gothard JW, Evans TW. Postoperative lung injury and oxidative damage in patients undergoing pulmonary resection. *Eur Respir J* 1998;11:1028-30.
- 7 Jordan S, Mitchell JA, Quinlan GJ, Goldstraw P, Evans TW. The pathogenesis of lung injury following pulmonary resection. *Eur Respir J* 2000;15:790-99.
- 8 Lases EC, Duurkens VAM, Gerritsen WBM, Haas FJLM. Oxidative stress after lung resection therapy. A pilot study. *CHEST* 2000;117:999-03.
- 9 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. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;27:379-83.
- 10 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. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;29:591-95.
- 11 Cheng Y-L, Chan K-C, Chien C-T, Sun W-Z, Lin C-J. Oxidative stress during 1-lung ventilation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132:513-18.
- 12 Gilbert HF. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. In: Meister A, (ed.) *Advances in enzymology*. New York: Wiley Interscience; 1990:p. 169-73.
- 13 Sies H. Glutathione and its cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999;27:916-21.
- 14 Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999;27:922-35.
- 15 Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004;134:489-92.
- 16 Del Rio D, Steward AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc* 2005;15:316-28.
- 17 Nair U, Bartsch H, Nair J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1109-20.
- 18 Asensi M, Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Estrela JM, Viña J. A high-performance liquid chromatography method for measurement of glutathione in biological samples. *Anal Biochem* 1994;217:323-28.
- 19 Brigelius R, Merckel C, Akerboon T, Sies H. Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 1983;32:2529-34.
- 20 Wong S H, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN Jr, Sunderman FW Jr. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 1987;33:214-20.
- 21 Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol* 2002;348:93-112.
- 22 Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1191-212.
- 23 Liu JQ, Folz RJ. Extracellular superoxide enhances 5-HT-induced murine pulmonary artery vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L111-8.
- 24 Keegan A, Morecroft I, Smillie D, Hicks MN, MacLean MR. Contribution of the 5-HT (1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT (1B)-receptor knockout mice and the 5-HT (1B/1D)-receptor antagonist GR127935. *Circ Res* 2001;89:1231-39.

- 25 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;121:249–59.
- 26 Kozian A, Schilling T, Fredén F, Maripuu E, Röcken C, Strang C, et al. One-lung ventilation induces hyperperfusion and alveolar damage in the ventilated lung: an experimental study. *Br J Anaesth* 2008;100:549–59.
- 27 Kevin LG, Camara AK, Riess ML, Novalija E, Stowe DF. Ischemic preconditioning alters real-time measure of O₂ radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H566–74.
- 28 Nohl H, Jordan W. The mitochondrial site of superoxide formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;138:533–39.
- 29 Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Shumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1998;273:18092–098.
- 30 Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004;61:461–70.
- 31 Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Cir Res* 2001;88:1259–66.
- 32 Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999;138:S69–S75.
- 33 Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1905–12.
- 34 Enns GM, Moore T, Le A, Atkuri K, Shah MK, Cusmano-Ozog K, et al. Degree of glutathione deficiency and redox imbalance depend on subtype of mitochondrial disease and clinical status. *PLOS ONE* 2014;9(6):e100001. doi:10.1371/journal.pone.0100001
- 35 Jones DP, Mody VC Jr., Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg P Jr. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defences. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1290–300.

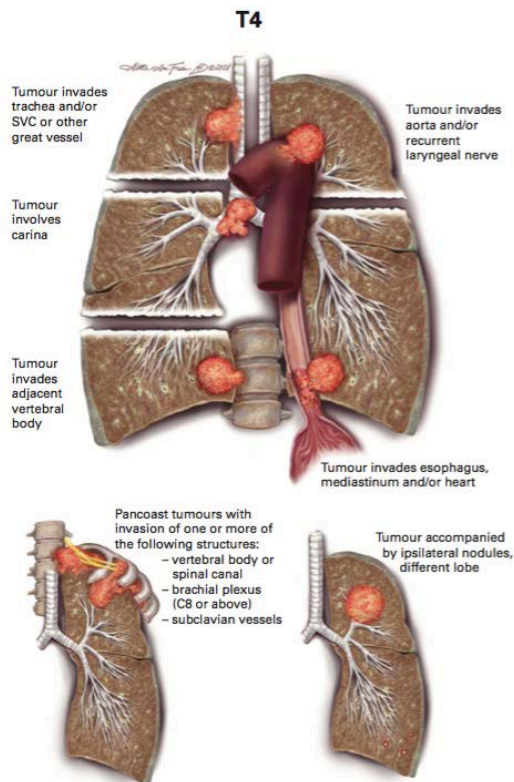
ANEXO 3: Clasificación TNM 7ª Edición, 2009

Imágenes tomadas de INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LUNG CANCER, **Staging Manual in Thoracic Oncology**. Peter Goldstraw, FRCS, Executive Editor 2009. Copyright ©2008 Aletta Ann Frazier, MD



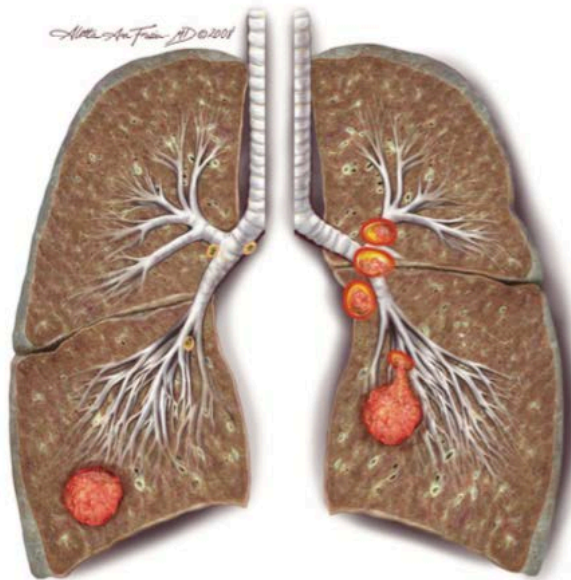


Note: any associated pleural effusion should be shown on multiple microscopical examinations to be negative for tumour; it should be non-bloody and not an exudate, and clinical judgement should dictate that the effusion is not related to the tumour.



N0

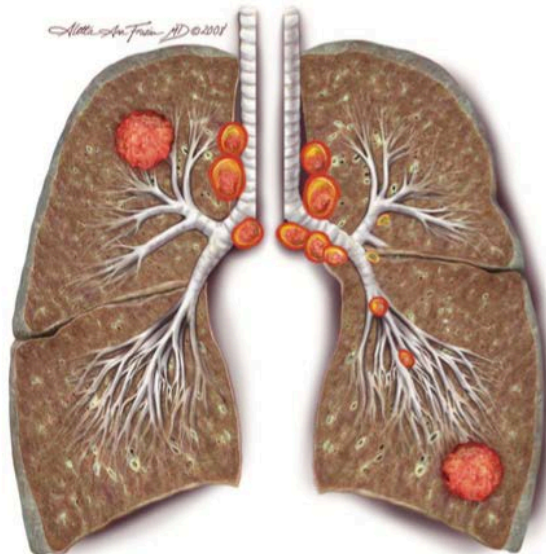
N1



No regional lymph node metastases

Metastasis in ipsilateral intrapulmonary/peribronchial/hilar lymph node(s), including nodal involvement by direct extension

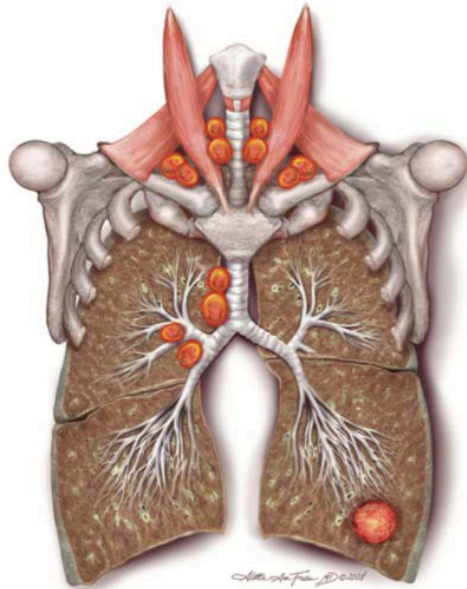
N2



Metastasis in ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph node(s), including "skip" metastasis without N1 involvement

Metastasis in ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph node(s) associated with N1 disease

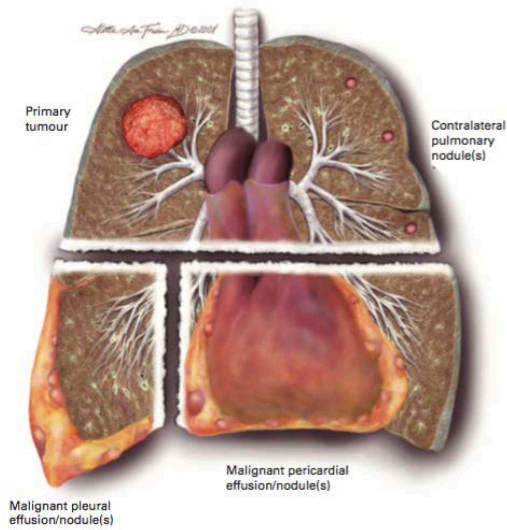
N3



Metastasis in contralateral hilar/mediastinal/scalene/supraclavicular lymph node(s)

Metastasis in ipsilateral scalene/supraclavicular lymph node(s)

M1a



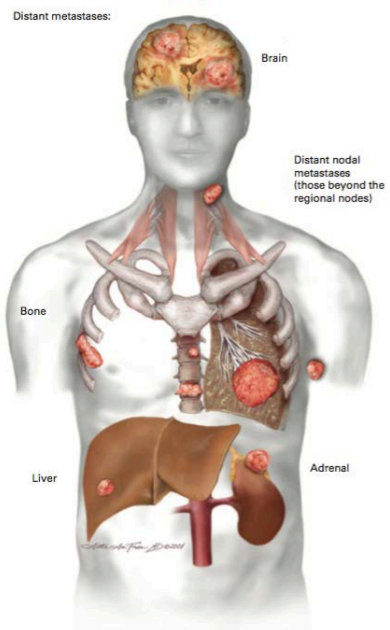
Primary tumour

Contralateral pulmonary nodule(s)

Malignant pleural effusion/nodule(s)

Malignant pericardial effusion/nodule(s)

M1b



Distant metastases:

Brain

Distant nodal metastases (those beyond the regional nodes)

Bone

Liver

Adrenal

T/M	Subgroup	N0	N1	N2	N3
T1	T1a	Ia	IIa	IIIa	IIIb
	T1b	Ia	IIa	IIIa	IIIb
T2	T2a	Ib	IIa	IIIa	IIIb
	T2b	IIa	IIb	IIIa	IIIb
T3	T3 _{>7}	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
	T3 _{Inv}	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
	T3 _{Satell}	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
T4	T4 _{Inv}	IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
	T4 _{Ipsi Nod}	IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
M1	M1a _{Contra Nod}	IV	IV	IV	IV
	M1a _{Pl Disem}	IV	IV	IV	IV
	M1b	IV	IV	IV	IV