

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Facultad de Veterinaria

Programa de Doctorado: Clínica Veterinaria e Investigación Terapéutica

Título de la Tesis:

“VALORACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DEL OZONO SOBRE EL RECHAZO CRÓNICO EN EL TRASPLANTE PULMONAR EXPERIMENTAL”

Tesis Doctoral presentada por D^a. Keila Eliam Zerecero Ramírez

Y Dirigida por el **Dr. D. Norberto Santana Rodríguez**, y codirigida por el **Dr. D. Bernardino Clavo Varas**, el **Dr. D. Pedro Llontop Santisteban**, el **Dr. D. José Manuel García Castellano** y el tutor del programa de doctorado el **Dr. D. José Alberto Montoya Alonso**.

El Director,

Codirectores,

El Tutor,

La Doctoranda,

Las Palmas de Gran Canaria a 9 de julio de 2013.



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Facultad de Veterinaria

TITULO DE LA TESIS

**“VALORACION DEL EFECTO PROTECTOR DEL OZONO, SOBRE EL
RECHAZO CRÓNICO EN EL TRASPLANTE PULMONAR EXPERIMENTAL”**

Tesis Doctoral presentada por:

DÑA. KEILA ELIAM ZERECERO RAMÍREZ

Dirigida por los Doctores:

DR. NORBERTO SANTANA RODRÍGUEZ

DR. BERNARDINO CLAVO VARAS

DR. PEDRO LLONTOPE SANTISTEBAN

DR. JOSÉ MANUEL GARCÍA CASTELLANO

Tutor del Programa de Doctorado:

DR. JOSÉ ALBERTO MONTOYA ALONSO

El Director, El Director, El Director, El Director, El Tutor, La Doctoranda

Las Palmas de Gran Canaria a 9 de julio del 2013.



Servicio
Canario de la Salud

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
GRAN CANARIA DOCTOR NEGRÍN



Gobierno
de Canarias

NORBERTO SANTANA RODRIGUEZ, DOCTOR EN MEDICINA, MEDICO ESPECIALISTA EN CIRUGÍA TORÁCICA Y RESPONSABLE DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DR.NEGRÍN DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “*Valoración del efecto protector del ozono sobre el rechazo crónico en el trasplante pulmonar experimental*” ha sido realizado por Dña. Keila Eliam Zerecero Ramírez, en la unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, bajo mi dirección y asesoramiento, una vez revisada la presente memoria la encuentro apta para su defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos extendiendo el presente certificado, en Las Palmas de Gran Canaria a 1 de julio del dos mil trece.

NORBERTO SANTANA RODRIGUEZ



Servicio
Canario de la Salud

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
GRAN CANARIA DOCTOR NEGRÍN



BERNARDINO CLAVO VARAS, DOCTOR EN MEDICINA, MEDICO ESPECIALISTA EN ONCOLOGIA RADIOTERAPICA E INVESTIGADOR DE LA UNIDAD DEL DOLOR CRÓNICO Y DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DR.NEGRÍN DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “*Valoración del efecto protector del ozono sobre el rechazo crónico en el trasplante pulmonar experimental*” ha sido realizado por Dña. Keila Eliam Zerecero Ramírez, en la unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, bajo mi dirección y asesoramiento, una vez revisada la presente memoria la encuentro apta para su defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos extendiendo el presente certificado, en Las Palmas de Gran Canaria a 28 de junio del dos mil trece.

BERNARDINO CLAVO VARAS



Servicio
Canario de la Salud

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
GRAN CANARIA DOCTOR NEGRÍN



PEDRO LLONTOP SANTISTEBAN, DOCTOR EN VETERINARIA E
INVESTIGADOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO DE GRAN CANARIA DR. NEGRIN

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “*Valoración del efecto protector del ozono sobre el rechazo crónico en el trasplante pulmonar experimental*” ha sido realizado por Dña. Keila Eliam Zerecero Ramírez, en la unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, bajo mi dirección y asesoramiento, una vez revisada la presente memoria la encuentro apta para su defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos extendiendo el presente certificado, en Las Palmas de Gran Canaria a 28 de junio del dos mil trece.

PEDRO LLONTOP SANTISTEBAN



Servicio
Canario de la Salud

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
GRAN CANARIA DOCTOR NEGRÍN



JOSE MANUEL GARCIA CASTELLANO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA E INVESTIGADOR CIENTÍFICO DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO INSULAR-MATERNAL INFANTIL DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “*Valoración del efecto protector del ozono sobre el rechazo crónico en el trasplante pulmonar experimental*” ha sido realizado por Dña. Keila Eliam Zerecero Ramírez, en la unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, bajo mi dirección y asesoramiento, una vez revisada la presente memoria la encuentro apta para su defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos extendiendo el presente certificado, en Las Palmas de Gran Canaria a 29 de junio del dos mil trece.

JOSE MANUEL GARCIA CASTELLANO



JOSÉ ALBERTO MONTOYA ALONSO, CATEDRÁTICO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Y DIRECTOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO “CLINICA VETERINARIA E INVESTIGACION TERAPEUTICA”

CERTIFICA:

Que Dña. Keila Eliam Zerecero Ramírez, Licenciada en Veterinaria por la Universidad Nacional Autónoma de México, ha sido realizado bajo mi tutoría el presente trabajo de tesis doctoral titulado *“Valoracion del efecto protector del ozono sobre el rechazo crónico en el trasplante pulmonar experimental”*.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos extendiendo el presente certificado, en Arucas (Las Palmas de Gran Canaria) a 9 de julio del dos mil trece.

J. ALBERTO MONTOYA ALONSO

FINANCIACIÓN

El proyecto de investigación que ha permitido la realización de esta tesis doctoral ha sido financiado por:

Entidad financiadora: Beca FIS del Instituto de Salud Carlos III

Proyecto de investigación: PI 10/01485

Título: “Valoración del efecto protector del ozono en el rechazo crónico del TP experimental”.

Investigador principal: Dr. Norberto Santana Rodríguez

Investigadores colaboradores: Dr. Pedro Llontop Santisteban y Dr. Bernardino Clavo Varas

Periodo: 2010-2013.

Cuantía económica: 35.000 Euros



AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo lo he podido realizar gracias a la colaboración y el apoyo de un amplio número de personas, todas con algún apoyo especial; desde una palabra hasta el aprendizaje de grandes cosas. Por ello, no puedo sino comenzar esta tesis expresando mi más profundo y sincero agradecimiento:

A mi director de tesis el Dr. Norberto Santana, por el apoyo para realizar esta tesis compartiendo conmigo tus ideas y planes para la realización de este proyecto, gracias también por hacerme un espacio dentro de tu grupo de investigación, por todas las cosas buenas que me has enseñado, por escucharme en los momentos difíciles y por ser un gran maestro y amigo. También agradezco mucho a toda tu familia, porque me abrieron las puertas de su casa y se han portado muy bien conmigo.

A mi director el Dr. Pedro Llontop, por tu amistad y apoyo incondicional, por tus enseñanzas y por llevarme prácticamente de la mano por el camino que tuve que recorrer para realizar ésta tesis, que sin tí no estaría terminada.

A mi director el Dr. Bernardino Clavo y a la Dra. M^a Dolores Fiuza, por enseñanzas, sus consejos, apoyo y por sus valiosas aportaciones que me permitieron enriquecer este escrito.

A mi director el Dr. José Manuel García Castellanos, y a mis compañeros Yanira Brito y Rubén Pérez Machín, gracias por lo mucho que me enseñaron, y por sus aportaciones para mí imprescindibles, por sus palabras de apoyo y por dedicarme un poco de su tiempo cada momento en que los he necesitado.

A mi tutor el Dr. J. Alberto Montoya Alonso, contar con usted ha sido un privilegio, gracias por todo lo aprendido mientras estaba en su curso de doctorado, por el apoyo brindado para todo; desde tramites, solución de problemas e incluso el solo hablar y por sus conocimientos que no dejan cada día de aportarme cosas buenas.

Al Dr. Ricardo Alfonso García Herrera, por empujarme y acompañarme al comienzo de esta aventura, por escucharme y estar a mi lado en los momentos difíciles apoyándome y mostrándome que se abren otras puertas, por cuidarme, orientarme en mi llegada y estancia en España y por las cosas nuevas que me enseñaste y sobre todo por darme el maravilloso regalo de tu amistad. ¡Te quiero mucho tío!.

A los roedores, lindas criaturitas que dieron su vida para regalarnos un poquito más de conocimiento para poder preservar de una mejor manera la salud y la vida de sus semejantes sin importar la especie a la que pertenezcan.



A mi amigo y compañero Freddy Alejandro Silva Sergent, por tu amistad y apoyo incondicional, por recorrer conmigo este camino del máster, del doctorado y por tu ayuda de siempre.

A mi amiga Tílines, por escucharme, aconsejarme, entenderme, por acogerme en tu familia, compartir tu mesa y tus amistades conmigo, por tu apoyo, por acompañarme y dejar que te acompañe; en fin por toda la larga lista de cosas, también agradezco a tus hermanos Guillermo y Alberto, a tus hijos Alfonso y María lo buenos que han sido conmigo, ustedes son como mi segunda familia, los quiero.

Finalmente y de manera muy especial a mi madre. Mami, te quiero mucho y siempre te quedaré agradecida por todo lo bueno que me has dado y que ha sido demasiado; te debo mi vida y mi carrera académica. Gracias por todo tu amor, por entender e impulsar esa pasión que me asaltó desde que comencé a ir a la escuela; el ser investigador y llegar a tener un doctorado y por los esfuerzos y sacrificios económicos que has hecho para pagarme la matrícula y el vivir en España. Pero principalmente agradezco a Dios por tenerte, por sus bondades y por todo lo bueno que me regaló al llegar a la Madre Patria.

*Bendito sea Jehová,
porque ha hecho maravillosa su misericordia
para conmigo en ciudad fortificada.*
Salmo 31:21

Keila Eliam Zerecero Ramírez.



RESUMEN

El trasplante pulmonar (TP) es la opción terapéutica aplicable al estado terminal de las patologías pulmonares no malignas. Desde la década de los años 80, se han realizado más de 21000 TP y aunque los pacientes mejoran su calidad de vida, la supervivencia global se ha estancado en un 53% a los 5 años. Esto se debe en gran parte a las complicaciones que conducen al rechazo del injerto y a la escasa repercusión clínica de los trabajos experimentales referentes al tratamiento de las mismas, de forma que, la incidencia de estas complicaciones y su evolución apenas se ha modificado en los últimos años.

Se sabe que el rechazo crónico (RC) es un proceso fibroproliferativo que produce la fibrosis del injerto y que continúa siendo el talón de Aquiles del TP. Un trabajo de nuestro grupo de investigación realizado con el fin de evaluar y entender los mecanismos moleculares involucrados etiológicamente en la presentación del RC por medio de DNA microarrays, ha permitido conocer la expresión génica de fenómenos relacionados con el propio RC, de procesos de reparación o compensación frente al mismo y del fenómenos de estrés oxidativo implicados en el RC, hasta ahora no bien conocidos.

Con el deseo de aportar una posible alternativa terapéutica para el control de estos mecanismos moleculares relacionados con el RC, con el fin de evitar o por lo menos retrasar su presentación, se ha desarrollado éste trabajo de investigación.

Para ello se diseñó un estudio experimental de trasplante pulmonar ortotópico izquierdo con donantes en muerte cerebral, en el cual se utilizaron un total de 36 ratas macho Sprague-Dawley consanguíneas que se distribuyeron de forma aleatoria en 4 grupos: 1.- grupo control [n=6], 2.- grupo sham [n=6], 3.- grupo TP [n=12; que corresponden a 6 donantes y 6 receptores] y 4.- grupo TP con ozono [n=12; que corresponden a 6 donantes y 6 receptores]. Los animales se sacrificaron a los 3 meses de la cirugía. En este estudio se evaluó: a) la evolución clínica de los animales, b) los cambios macroscópicos del injerto, c) el estudio histológico del injerto y d) la determinación genética por medio de RT-PCR.

En la evaluación macroscópica de los animales tratados con ozono se observó una importante preservación de la arquitectura pulmonar lo que no se observó en el grupo de TP. Los hallazgos histológicos demostraron que todos los animales el grupo de TP presentaron signos de RC severo, mientras que los pulmones de los animales que recibieron tratamiento con ozono mostraron ausencia de los mismos. El estudio genómico demostró que el tratamiento influye en la modulación de la actividad antioxidante, así como de los signos de inflamación y angiogénesis inducidos por la hipoxia.



Desde el punto de vista traslacional, el tratamiento con ozono puede ser una nueva alternativa de tratamiento y/o prevención del RC con el que alargar y mejorar la calidad de vida del paciente que ha sido sometido a un TP. Esta alternativa tiene la ventaja de que no presenta efectos adversos, es de fácil administración, económico y además tiene otros efectos beneficiosos corporales al frenar los procesos oxidativos.



INDICES

INTRODUCCIÓN	1
1. Trasplante pulmonar	1
1.1. Definición y conceptos.....	1
1.2. Consideraciones generales.....	1
1.3. Reseña histórica del TP.....	2
1.4. Situación del TP experimental.....	4
1.5. Tipos de TP.....	4
1.6. Indicaciones para el TP.....	5
1.6.1. Enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID).....	5
1.6.2. Fibrosis quística (FQ) y otras bronquietásias.....	6
1.6.3. Enfermedades pulmonares obstructivas.....	7
1.6.4. Enfermedades vasculares pulmonares.....	8
1.6.5. Indicaciones para realizar un TP pediátrico.....	9
1.7. Contraindicaciones para realizar el TP.....	10
1.7.1. Contraindicaciones absolutas.....	10
1.7.1. Contraindicaciones relativas.....	11
1.8. Selección del receptor.....	11
1.8.1. Exámenes y pruebas de laboratorio que se deben realizar al paciente potencial receptor de un TP.....	12
1.8.2. Evaluación de la comorbilidad del receptor.....	12
1.9. Selección del donante.....	13
1.9.1. Donantes en muerte cerebral.....	13
1.9.2. Donantes en asistolia.....	16
1.9.3. Donantes vivos.....	17
1.9.4. Mantenimiento y cuidados del donante.....	18
1.10. Compatibilidad donante-receptor.....	18
1.11. Resultados del TP.....	19
1.11.1. Supervivencia.....	19
1.11.2. Calidad de vida.....	20
1.12. Complicaciones en el TP.....	20
1.12.1. Complicaciones precoces.....	21
1.12.1.1. Atribuibles al acto quirúrgico.....	21
1.12.1.2. Pulmonares.....	23
1.12.1.3. Infecciosas.....	25
1.12.1.4. Generales.....	28
1.12.2. Complicaciones tardías.....	29
1.12.2.1 Procesos linfoproliferativos o neoplasias.....	29
1.12.2.2. Rechazo crónico (RC) y bronquitis obliterante (BO).....	29
1.12.2.3. Toxicidad farmacológica.....	31
2. La terapia con Ozono	32
2.1. Descubrimiento del ozono y su historia en la medicina.....	32
2.2. Propiedades físicas y químicas del ozono.....	33
2.3. El ozono ambiental y su toxicidad.....	33



2.4. Producción de ozono para la práctica médica y su dosificación.....	35
2.4.1. La concentración de ozono.....	36
2.5. Mecanismo de acción del ozono.....	37
2.6. Vías de administración del ozono.....	42
2.7. Efectos secundarios y contraindicaciones del ozono.....	47
2.7.1. Efectos adversos de la terapia con ozono.....	47
2.7.2. Contraindicaciones para utilizar la terapia con ozono.....	49
2.7.3. Recomendaciones para evitar los efectos adversos en la ozonoterapia.....	50
JUSTIFICACION.....	52
OBJETIVOS.....	54
MATERIAL Y METODO.....	55
1. Sujetos de estudio.....	55
1.1. Características de alojamiento y manutención.....	55
1.2. Normativa para el uso, protección y cuidado del animal de laboratorio.....	55
2. Instalaciones y equipo.....	56
3. Material quirúrgico y fungible.....	56
4. Medicación anestésica y analgésica.....	57
5. Equipo y reactivos para el análisis y procesamiento de las muestras.....	57
6. Diseño del estudio.....	58
7. Técnica quirúrgica.....	59
7.1. Inducción de la muerte cerebral y extracción del pulmón donante.....	59
7.2. Implante del injerto en el receptor.....	61
8. Cuidados postquirúrgicos y tratamiento con ozono.....	63
8.1. El tratamiento con ozono.....	63
9. Sacrificio del animal trasplantado.....	63
10. Mediciones.....	64
10.1. Respuesta clínica al trasplante.....	64
10.2. Determinaciones histológicas.....	64
10.3. Determinaciones genómicas.....	65
10.3.1. Extracción de RNA y síntesis de DNA.....	65



10.3.2. Determinación de la expresión genómica mediante RT-PCR.....	66
10.4. Análisis estadístico.....	67
RESULTADOS	68
1. Evolución clínica postoperatoria.....	68
2. Descripción macroscópica de los pulmones.....	68
3. Determinaciones histológicas.....	69
4.- Análisis de la expresión genética por RT-PCR.....	71
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFIA	84



Tabla I.	Comorbilidad en el receptor de trasplante pulmonar.....	13
Tabla II.	Grados del rechazo agudo.....	24
Tabla III.	Clasificación clínica de la BO.....	30
Tabla IV.	Toxicidad farmacológica.....	31
Tabla V.	Efectos tóxicos del ozono.....	34
Tabla VI.	Sistema de antioxidantes.....	42
Tabla VII.	Vías de administración del ozono.....	43
Tabla VIII.	Condiciones de la RT-PCR.....	66
Tabla IX.	Tiempos invertidos en la realización de los TP experimentales.....	68
Tabla X.	Hallazgos histológicos con hematoxilina y eosina.....	71
Tabla XI.	Expresión génica del pulmón sham vs el pulmón trasplantado.....	71
Tabla XII.	Expresión génica del pulmón sham vs el pulmón trasplantado y tratado con ozono.....	72
Tabla XIII.	Expresión génica del pulmón trasplantado vs el pulmón trasplantado y tratado con ozono.....	72



Figura 1.	Reacción natural de formación de ozono.....	33
Figura 2.	Localización del ozono ambiental.....	34
Figura 3.	Corona de descarga.....	35
Figura 4.	Diagrama de instalaciones para ozonoterapia.....	36
Figura 5.	Formación de peróxido de hidrógeno a partir de la administración de ozono.....	38
Figura 6.	Inducción del estrés oxidativo transitorio y controlado por los antioxidantes de la sangre.....	38
Figura 7.	Efectos de los productos del estrés oxidativo inducido por la ozonoterapia.....	40
Figura 8.	Filtro antibacterial del ozonador.....	43
Figura 9.	Rata Sprague-Dawley.....	55
Figura 10.	Quirófano 1 de la Unidad de Investigación del HUGC Dr. Negrín.....	56
Figura 11.	Instrumental microquirúrgico.....	57
Figura 12.	Cuff y pinza yasargil.....	57
Figura 13.	Medicación anestésica y analgésica.....	57
Figura 14.	Intubación orotraqueal.....	59
Figura 15.	Inducción de muerte cerebral.....	59
Figura 16.	Esternotomía media y perfusión pulmonar.....	60
Figura 17.	Colocación de cuff's.....	61
Figura 18.	Hilio pulmonar disecado.....	61
Figura 19.	Anastomosis del injerto pulmonar.....	62
Figura 20.	Ozonosan Alpha plus® Dr.Hänsler Nordring, Germany.....	63
Figura 21.	Administración rectal de ozono.....	63
Figura 22.	Toracotomía de un animal trasplantado a los 3 meses.....	64
Figura 23.	Bloque pulmonar de un individuo del grupo TP.....	69
Figura 24.	Bloque pulmonar de un individuo del grupo TP-O ₃	69
Figura 25.	Pulmón histológicamente sano.....	70
Figura 26.	Infiltrados linfoplasmocitarios perivasculares e intensa vasculitis.....	70
Figura 27.	Grupo de TP-O ₃ mostrando rechazo agudo leve.....	70
Figura 28.	Sham vs TP.....	73
Figura 29.	Sham vs TP-O ₃	73
Figura 30.	TP vs TP-O ₃	74



ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Adenosindifosfato
AHT	Autohemoterapia ozonizada
AMP	Adenosinmonofosfato
AP	Antero-posterior
ARMD	Degeneración macular
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Adenosintrifosfato
BAL	Antibodies levels
bHJH-PAS	Basic hélix-loop-helix PAS
BO	Bronquitis obliterante
BTB	Biopsia transbronquial
°C	Grados centígrados
C₅H₄N₄O₃	Acido úrico
C₆H₈O₆	Acido Ascórbico
Ca⁺⁺	Calcio
CEC	Circulación extracorpórea
CFCs	Clorofluorocarbonados
CH₄	Metano
Cldn5	Claudin 5
cm	centímetros
CMV	Citomegalovirus
CO	Monóxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CV	Capacidad vital
DBP	Solución de dextrano baja en potasio
DEZn	Dietil-zinc
DLCO	Capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono
DSIP	Delta sleep inducing peptide immunoreactor
EC	Solución de Eurocollins
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECMO	Circulación extracorpórea con oxigenación de membrana
EPAS-1	Endothelial PAS domain protin 1
EPID	Enfermedad pulmonar intersticial difusa
EPN	Edema pulmonar neurogénico
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
F2-IsoPs	F2-isoprostanos
Fas	Proteína de superficie ligada al TNF
Fe	Hierro
Fe²⁺	Ion ferroso
Fe³⁺	Ion ferrico
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
FEV₁	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FiO₂	Fracción de oxígeno inspirado
FMO2	Flavin mono-oxigenasa 2
FN-κβ	Factor nuclear kappa-beta



FP	Fibrosis pulmonar
FPI	Fallo primario del injerto
FQ	Fibrosis quística
FR	Frecuencia respiratoria
g	Gramos
G-6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
g/mol	Gramos por mol
G-GPD	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GPX	Glutación peroxidasa
GPX-3	Glutathione peroxidase 3
GSH	Glutación reducido
GSH-Rd	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
GSH-T	Gutation transferasa
H⁺	Hidrógeno
HCIO	Acido hipocloroso
HCSC	Hospital Clínico San Carlos
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H₂SO₄	Acido sulfúrico
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HIF1a	Hipoxia inducible factor 1-alpha
Hspb27	Heat shock 27 kDa protein 1
HLA	Antígenos de histocompatibilidad
HTP	Hipertensión pulmonar
IA	Intraarterial
IAr	Intraarticular
ID	Intradiscal
I/E	Relación inspiratoria/espiratoria
IF	Intraforaminal
ILx	Intradiscal
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
IPL	Intrapleura
IV	Intravenosa
IL-1	Interleukina 1
IL-2	Interleukina-2
IL-8	Interleukina-8
IL-12	Interleukina-1
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
K⁺	Potasio
KLF2	Krüppel-like factor 2
km/m³	Kilómetros por metro cúbico
L/min	Litros por minuto
LIR	Lesion de isquemia-reperfusión
LRSg	Lung Rejection Study Group



LOPs	Productos de la oxidación lipídica
mcg/kg	Microgramos por kilo
mcg/L	Microgramos por litro
mcg/ml	Microgramos por mililitro
MDA	Malonildialdehído
MgCl₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitros
min/m²	Minutos por metro cuadrado
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercurio
µm	Micrometros
µl	Microlitros
Na⁺	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanometros
NO	Oxido nítrico ó monóxido de nitrógeno
NO₂	Dióxido de nitrógeno
NYHA	New York Heart Association
ONT	Organización Nacional de Trasplantes
O₂	Oxígeno
O₂⁻	Anión superóxido
O₃	Ozono
OH[·]	Radical hidroxilo
O=NOO⁻	Peroxinitrito
PaO₂	Presión alveolar de oxígeno
PCO₂	Presión parcial de anhídrico carbónico
PEEP	Presión positiva al final de la espiración
PGE₁	Prostaglandina E 1
pH	Potencial hidrógeno
Plvap	Plasmalemma vesicle associated protein
ppmv	Partes por millón volumen
PO	Oral
POAD	Enfermedad arterial periférica oclusiva
PO₂	Presión parcial de oxígeno
Prdx-6	Peroxiredoxin 6
PUFAs	Acidos grasos poliinsaturados
PVC	presión venosa central
RA	Rechazo agudo
RC	Rechazo crónico
RCP	Resucitación cardio-pulmonar
RHA	Rechazo hiperagudo
RLO	Radicales libres de oxígeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ROO	Radicales peroxil
R-OOH	Hidroxiperóxidos
RTLfs	Capacidad amortiguante y antioxidante de los fluidos del tracto respiratorio



RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RX	Radiografías
SC	Subcutáneo
SD	Sprague-Dawley
Sepp-1	Selenoprotein P, plasma 1
SH⁻	Sulfhidrilo
SLE	Lupus eritematoso sistémico
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SP-A1	Proteína surfactante A1
SP-B	Proteína surfactante B
Sftp-a1	Surfactant pulmonary-associated protein A1
Sftp-b	Surfactant pulmonary-associated protein B
spp	Especies de, subespecies
TAS	Status total de antioxidantes
TCP	Trasplante cardio-bipulmonar
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante beta
Thbd	Trombomodulin
Tj	Tight junction
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF-γ	Factor de necrosis tumoral beta
TP	Trasplante pulmonar
UI/kg	Unidades internacionales por kilo
UMI	Unidad de medicina intensiva
UW	Universidad de Wisconsin
VCAM-1	Vascular cell adhesión molecule 1
Vegf-A	Vascular endothelium growth factor
VEMS	Ventilación espiratoria máxima en el primer segundo
WHO	Organización mundial de la salud
2,3-DPG	2,3-Difosfoglicerato
4-HNE	4-Hidroxi-2,3 transnonenal
8-OHdG	8-Hidroxi-2-deoxiguanosina



INTRODUCCIÓN

1. El Trasplante Pulmonar

1.1. Definición y conceptos de trasplante.

El trasplante se define como el proceso en el cual se extrae un injerto de un individuo (donante), compuesto ya sea de células, tejidos u órganos y que se implanta en otro individuo (receptor)⁽¹⁾.

Nos referimos a trasplante ortotópico cuando el injerto se coloca en su localización anatómica habitual, como es el caso del pulmón o el corazón y a trasplante heterotópico si se implanta en una zona diferente del organismo, como por ejemplo piel o grasa⁽¹⁾.

La relación genética entre el receptor y el injerto establece denominaciones diferentes entre los tipos de trasplantes⁽¹⁾:

- ✓ Alogénica.- entre individuos de la misma especie, pero genéticamente diferentes.
- ✓ Singénica.- cuando la relación se establece entre individuos idénticos, como por ejemplo entre gemelos homocigóticos.
- ✓ Autotrasplante.- cuando el injerto se implanta de un lugar a otro en el mismo individuo.
- ✓ Xenotrasplante.- Cuando se realiza entre individuos de una especie diferente.

1.2. Consideraciones generales.

El trasplante pulmonar (TP) que se realiza en la actualidad es alogénico y ortotópico y es la opción terapéutica de las enfermedades respiratorias no malignas en fase terminal. Desde 1980 se han realizado más de 25.000 TP en todo el mundo y este número sigue incrementándose progresivamente, gracias a los avances en la preparación preoperatoria de los pacientes, las maniobras de preservación del órgano, la técnica quirúrgica, los fármacos inmunosupresores y el control postoperatorio de los pacientes. La mayoría de los pacientes trasplantados experimentan una mejora considerable de su calidad de vida, lo que ha consolidado a este procedimiento quirúrgico, aunque la supervivencia actual global ronda el 50% a los 5 años y no ha variado en los últimos 15 años.

En el año 1990 en el Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, España se realizó el primer TP exitoso. Posteriormente el resto de médicos españoles de los grupos dedicados a TP comenzaron su actividad, comenzando por el Hospital Gregorio Marañón (Madrid, 1990), el Hospital Puerta de Hierro (Madrid, 1991), el Hospital de la Fe (Valencia, 1992), el Hospital Reina Sofía (Córdoba, 1993), el Hospital Márquez de



Valdecilla (Santander, 1997), el Hospital Juan Canalejo (La Coruña, 1999) y por último se incorporó el Hospital 12 de Octubre (Madrid, 2008)⁽²⁾.

Actualmente existen 7 centros en España en donde se realiza TP y cubren una población aproximada de 6,8 millones de habitantes en cada centro, llegando a alcanzar la cifra de 235 en el año 2010⁽³⁾.

1.3. Reseña histórica del trasplante pulmonar.

El TP experimental se inició en la Unión Soviética cuando *Demikov* realizó, en 1946, el primer trasplante cardiopulmonar en un perro. Un año más tarde efectuaría un trasplante unipulmonar, ambos sin éxito⁽⁴⁾.

En 1950 en Francia, *Metras* fue quien realizó el primer TP experimental con éxito y publicó su serie de 20 trasplantes con supervivencias de 3 semanas. Este autor introdujo la técnica del implante pulmonar que apenas se ha modificado con el paso del tiempo, siendo la secuencia preferida para las anastomosis la del bronquio, seguido de la arteria y por último de la aurícula⁽⁵⁾.

Hardy en 1963, realizó el primer TP unilateral en humanos, falleciendo el enfermo a los 15 días de insuficiencia renal⁽⁶⁾. *Derom* fue quien consiguió la mayor supervivencia al realizar un TP, el paciente falleció a los 10 meses posteriores al proceso quirúrgico debido a un rechazo crónico, sepsis y estenosis bronquial⁽⁷⁾.

Entre los años 1963 y 1977 se realizaron 38 TP, en los que la inmunosupresión se realizó principalmente con corticoides y azatioprina, de los cuales sólo 9 pacientes sobrevivieron más de 15 días. La mayor parte de éstos fallecieron por infección y dehiscencia de la anastomosis bronquial⁽⁸⁻¹⁵⁾.

En 1970 como alternativas para el control del problema constante de dehiscencia de las anastomosis, *Trummer* describió la técnica de anastomosis bronquial del implante con el bronquio corto con posterior omentopexia de la misma⁽¹⁶⁾; *Veith* describió la técnica del telescopado bronquial⁽¹⁷⁾, pero *Lima* fue quien comprobó que el tratamiento con prednisona administrada para la inmunosupresión del paciente, era el factor causal de retraso en la cicatrización bronquial⁽¹⁸⁾.

Con el descubrimiento de la ciclosporina, el régimen del tratamiento inmunosupresor revolucionó el mundo de los trasplantes, el número de presentación de las dehiscencias de las anastomosis disminuyó significativamente⁽¹⁹⁾. Por otra parte *Dubois* comprobó que con la omentopexia se restablecen comunicaciones con la circulación bronquial distal, preservando la viabilidad de la anastomosis bronquial⁽²⁰⁾.



El grupo Toronto, dirigido por *Cooper* en 1983, iniciaron un programa de TP en pacientes afectados con fibrosis pulmonar (FP) no grave, consiguiendo en un paciente de 58 años de edad una supervivencia a largo plazo de 6 años y que murió por insuficiencia renal⁽²¹⁾. Luego en 1987 publicaron los 5 primeros casos de TP unilateral con sólo un fallecimiento⁽²²⁾, y en 1989 *Pearson* presentó 16 TP unilaterales con sólo 4 muertes. Con ello se iniciaba la andadura clínica de la cirugía del TP⁽²³⁾.

El siguiente paso para solventar era el realizar con éxito el TP bilateral para la patología séptica y, por aquel entonces, el enfisema pulmonar. Y *Dark* en 1986 realizó un trabajo experimental en primates a los que realizaban un trasplante en bloque de ambos pulmones sin el corazón, con buenos resultados tanto a corto como a largo plazo⁽²⁴⁾; procedimiento que posteriormente, el grupo de Toronto incorporó a la clínica humana, comunicando en 1988 seis casos de trasplante en bloque^(25,26).

Patterson en 1988, publicó que dentro de sus primeros 16 casos, tres desarrollaron una necrosis isquémica fatal en la tráquea y ambos bronquios⁽²⁷⁾, explicando que el hecho podía ser consecuencia de la falta de la irrigación colateral coronario-bronquial. Mientras que en Europa, *Noirclerc* propuso en la técnica quirúrgica la variante de acortar la longitud del bronquio principal en el donante para minimizar el riesgo de la isquemia⁽²⁸⁾, tomando en cuenta la vía retrógrada de vascularización bronquial a expensas de las anastomosis entre las arterias pulmonares y las bronquiales descritas por *París y López-Merino*⁽²⁹⁾.

En 1990 *Pasque* y su grupo St. Louis presentaron los primeros tres casos de pacientes operados con esta técnica y al año siguiente comunicaron otros 24 casos, indicando como candidatos a pacientes con fibrosis quística (FQ), las bronquiectasias y enfisema pulmonar bilateral, reportando como ventajas de ésta técnica: a) la anastomosis a nivel bronquial, dejando “in situ” el corazón del receptor, reducía al máximo las complicaciones isquémicas en la cicatrización de la vía aérea, b) se obviaba la necesidad de CEC de inicio, y sólo se empleaba de necesidad cuando las circunstancias hemodinámicas y de intercambio gaseoso lo requerían (25% de los casos), c) se mantenía la inervación cardíaca, y se evitaba la disección de la tráquea, región subcarinal y mediastino posterior del receptor, d) no precisaba isquemia cardíaca cuando se realizaba la sutura del parche atrial, como ocurría en el caso del trasplante en bloque. Con todo ello, se evitaba deteriorar a los pacientes con disfunción miocárdica y se prevenía la inestabilidad hemodinámica postoperatoria⁽³⁰⁻³³⁾.



1.4. Situación del TP experimental.

Como mencionamos anteriormente, el primer modelo animal de TP experimental fue referido en el perro, sin embargo los problemas éticos y económicos que implicaba el uso de este modelo hicieron que los investigadores buscaran otras alternativas animales como el conejo y la rata.

En 1982, *Marck y Wildevuur* desarrollaron con éxito la técnica del TP en ratas, aunque con grandes dificultades técnicas para la realización de las anastomosis vasculares y bronquiales, que alargaban el tiempo quirúrgico, teniendo como consecuencia una elevada mortalidad postoperatoria, por lo que este modelo no se consideraba asequible para el estudio del TP⁽³⁴⁾.

La complejidad de ésta técnica mejoró con la aportación de *Mizuta* en 1989, quien realizaba las anastomosis vasculares mediante la ayuda de los “cuffs”, pequeños cilindros de 2 mm elaborados a partir de catéteres de venopunción. Las anastomosis bronquiales las realizaba solo con sutura. Esta modificación técnica hizo que los tiempos quirúrgicos y la mortalidad postoperatoria se redujeran significativamente⁽³⁵⁾.

Mizuta y Shiraishi en 1995, realizaron una modificación de la técnica quirúrgica extrayendo el bloque cardiopulmonar por esternotomía media con el pulmón en semi-insuflación para luego disecar y preparar el pulmón izquierdo para el implante, lo que facilitaba y acortaba la extracción⁽³⁶⁾. En ese mismo año *Reis* presentaba otra mejora de la técnica quirúrgica al realizar la anastomosis bronquial con los cuffs, con la que acortaba aún más el tiempo quirúrgico del implante haciendo la técnica más asequible. Además, introdujo los cuffs de teflón evidenciando una menor estenosis de las anastomosis⁽³⁷⁾.

Nosotros en el presente trabajo, presentamos el modelo experimental de rata con donante en muerte cerebral y que además controlamos el tiempo de isquemia y referimos la descripción de la reperusión secuencial⁽³⁸⁾.

1.5. Tipos de TP que se realizan actualmente.

Unilateral. Se trasplanta un pulmón, ya sea derecho o izquierdo realizando anastomosis del bronquio principal y de los vasos sanguíneos (arteria y vena pulmonares).

Bilaterales. En donde se trasplantan ambos pulmones y puede ser en:

- **Bloque.-** Se implantan ambos pulmones realizando una anastomosis traqueal, la anastomosis de la arteria pulmonar principal y un parche en la aurícula izquierda que contiene las cuatro venas.



- *Bilateral secuencial.*- Se implanta primero un pulmón y posteriormente se implanta en contralateral, realizando la anastomosis bronquial, arterial y venosa independientemente en cada pulmón.
- *Cardiopulmonar.*- Se reemplaza en bloque el corazón y ambos pulmones, realizando una anastomosis traqueal y las anastomosis propias del trasplante cardiaco aislado.
- *Lobar.*- Se trasplanta un lóbulo para realizar un trasplante unilateral o dos lóbulos para realizar un TP bilateral⁽³⁹⁾.

1.6. Indicaciones para realizar el TP.

El trasplante pulmonar está indicado como la alternativa terapéutica de enfermedades pulmonares no malignas en fase terminal cuando fracasan otras alternativas de tratamiento y cuando quizás la expectativa de vida a plantear según el criterio médico esté por debajo de los dos años. Se plantea al realizar un TP a éstos pacientes que la expectativa de vida que se les ofrezca esté por encima a la que alcanzaría sin el TP⁽⁴⁰⁾.

Además de evaluar la situación y la historia clínica completa del paciente, debemos profundizar en aquellos factores de riesgo específicos con el fin de identificar el período (ventana del trasplante) en el cual se debe de plantear esta opción terapéutica, por lo cual englobamos las patologías pulmonares en los siguientes grupos⁽⁴¹⁻⁴³⁾:

1.6.1. Enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID).

Que se compone de un grupo heterogéneo de patologías que evolucionan a fibrosis pulmonar (FP) hasta causar un fallo respiratorio. La más frecuente es la FP idiopática y de etiología desconocida. En este grupo, los pacientes suelen tener una edad promedio entre los 40-70 años y con frecuencia presentan una patología extrapulmonar (alteraciones digestivas, cardíacas, efectos secundarios de la medicación inmunosupresora, corticoides) y pulmonar secundaria (carcinoma broncogénico, TBC pulmonar, zonas de bronquiectasias colonizadas por patógenos).

Para evaluar el estado de la gravedad de ésta enfermedad es necesario realizar una prueba de esfuerzo, ya que en ocasiones los resultados de las pruebas respiratorias no evidencian el desarrollo de la misma. En los casos en donde los pacientes ya se encuentran en una fase terminal, continuar con el tratamiento con fármacos esteroides y otros agentes inmunosupresores no han demostrado proporcionar algún tipo de beneficio.

Los pacientes con FP idiopática que cumplan los siguientes requisitos deberán ser considerados como posibles candidatos para inclusión en la lista de espera para TP:



- a) Enfermedad sintomática y progresiva no controlada con esteroides o inmunosupresores (desaturación en reposo y/o con el ejercicio), demostrada con controles cada 3 meses evaluando la respuesta al tratamiento.
- b) Deterioro de la función pulmonar, incluso en pacientes con escasos síntomas.
- c) Capacidad vital (CV) entre el 60 y 70% y/o capacidad de difusión pulmonar del monóxido de carbono (DLCO) entre el 50 y 60%.

La FP asociada a una enfermedad sistémica como ocurre en la esclerodermia, la artritis reumatoide, la sarcoidosis o postquimioterapia deben considerarse individualmente. En general, se requiere que exista poca actividad sistémica de la enfermedad y que cumplan todos los criterios generales médicos. Además, deben haber fracasado todas las demás opciones terapéuticas. Cumplidos estos requisitos, se aplican los mismos criterios que para la FP idiopática. En los casos de FP es recomendable, siempre que se pueda, un TP bipulmonar frente al unilateral.

1.6.2. Fibrosis quística (FQ) y otras causas de bronquiectasias.

En este grupo se encuentra la FQ y otras tipos de bronquiectasias como deficiencias estructurales o funcionales de la motilidad ciliar, el síndrome de Kartagener o inmunodeficiencias. En todas ellas se da la particularidad de que los pacientes presentan colonización por patógenos en ocasiones multiresistentes e incluso panresistentes; suelen hallarse la *Pseudomonas aeruginosa* y con menos frecuencia la *Burkholderia cepacia*. Sin embargo, la presencia de estos gérmenes no es una contraindicación absoluta para el trasplante, pero si son factor potencial del aumento de la morbilidad y la mortalidad en el periodo postoperatorio inmediato. En estas enfermedades el tipo de trasplante que se recomienda que se debe realizar es el bilateral, para evitar el paso de los gérmenes del pulmón nativo al recién implantado, independientemente de ser remitido a un centro trasplantador con posibilidad de realizar pruebas de sensibilidades antibióticas y valorar distintas combinaciones de antibióticos que sean efectivas “in vivo”⁽⁴⁴⁾.

Los parámetros para identificar a los pacientes con FQ o bronquiectasias como candidatos a TP en período de ventana, y que suponen una expectativa de supervivencia inferior al 50% a los 2 años, son los siguientes:

- a) $FEV_1 < 30\%$.
- b) $PCO_2 > 50$ mmHg.
- c) $PO_2 < 55$ mmHg.



Si el paciente presenta además de los criterios clásicos expuestos:

- a) Deterioro progresivo de la función respiratoria incluso con un deterioro rápido del FEV₁ o que se encuentre superior al 30% del previsto que condicione un aumento del número de hospitalizaciones
- b) Hemoptisis masiva recidivante acompañada de una desnutrición severa a pesar del tratamiento médico correcto

Se consideran como signos de alerta y el paciente debe ser remitido lo antes posible a una unidad de TP para un contacto inicial. Las mujeres jóvenes con estos parámetros tienen peor pronóstico, y por tanto deben ser remitidas para valoración con carácter urgente a un centro de referencia de TP.

1.6.3. Enfermedades pulmonares obstructivas.

En este grupo englobamos a los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) no bronquiectásica (en sus variantes bronquitis crónica o enfisema), la deficiencia de alfa-1-antitripsina y a la bronquiolitis obliterante (BO).

Se debe considerar al paciente como un potencial candidato a TP si presenta:

- a) FEV₁ < 25%.
- b) PCO₂ ≥ 55 mmHg. Generalmente los pacientes que presentan una PCO₂ elevada y oxigenoterapia domiciliaria crónica de largo tiempo tienen peor pronóstico, por lo que deben de ser evaluados con carácter de urgente.
- c) Hipertensión pulmonar con cor pulmonale crónico.

Estos parámetros asociados a la edad del paciente, estado nutricional y el grado de hipertensión pulmonar, se identifican como los mejores índices para dar un pronóstico sobre la evolución del procedimiento, pero no son parámetros funcionales que permiten esclarecer el momento para la inclusión del paciente al programa de trasplante, ya que con la oxigenoterapia asociada a la rehabilitación respiratoria el paciente puede prolongar su supervivencia⁽⁴¹⁾.

Recientemente en un estudio publicado en el New England Journal of Medicine se ha descrito el índice “BODE”, en el que se demostró su capacidad de predecir la mortalidad de los pacientes con EPOC y consiste en un sistema multivariable (B índice de masa corporal, O grado de obstrucción, D grado de disnea, E capacidad de ejercicio), quizás en un futuro próximo ayude a seleccionar mejor los pacientes para trasplante^(40,42).



1.6.4. Enfermedades vasculares pulmonares.

La Hipertensión pulmonar (HTP) se define como la existencia de una presión media de la arteria pulmonar (PAPm) mayor de 25mmHg en reposo. Se mide por cateterismo cardiaco derecho. En función de la presión capilar se diferencian en dos grupos:

- I. HTP precapilar, cuando la presión enclavada es menor o igual a 15 mmHg. A este grupo pertenece la HTP idiopática, la HTP debida a enfermedades pulmonares, el tromboembolismo crónico, la enfermedad venooclusiva, la hemangiomatosis capilar, los fármacos y las conectivopatías.
- II. HTP postcapilar, cuando esta presión es superior a 15 mmHg. A este grupo pertenece la HTP causada por una insuficiencia cardíaca izquierda que puede ser de etiología primaria o secundaria a otra enfermedad⁽⁴⁵⁾.

En todos estos pacientes de forma previa se debe realizar una prueba de vasorreactividad y haber instaurado un tratamiento con vasodilatadores, optimizándolo con el uso de la oxigenoterapia, antagonistas del calcio (Ca^{++}), anticoagulación y prostaciclina. En algunos casos, se requerirá de tratamiento quirúrgico (septostomía atrial o endarterectomía), dependiendo del proceso primario desencadenante. Pero a pesar de todas estas indicaciones, los pacientes con HTP tienen un pronóstico desfavorable de supervivencia después de realizar el TP.

Todos los pacientes deben de ser evaluados en un centro con experiencia en tratamiento vasodilatador antes del trasplante. Los criterios que debe cumplir un paciente con HTP, sin enfermedad cardíaca primaria congénita, para ser considerado en ventana de TP son los siguientes:

- a) Enfermedad sintomática y progresiva, a pesar del tratamiento óptimo médico y/o quirúrgico que condiciona una disnea grado III-IV en la escala de la New York Heart Association (NYHA).
- b) Índice cardíaco menor de $21/\text{min}/\text{m}^2$, presión en la aurícula derecha superior a 15mmHg y presión media en la arteria pulmonar superior a 55mmHg.

En la HTP secundaria al Síndrome de Eisenmenger, el papel de la medicación vasodilatadora en el período pre-trasplante no está bien establecido, considerándose el TP ante todo paciente con síntomas progresivos y disnea grado III-IV de la NYHA, a pesar de tratamiento óptimo. En todos los casos de HTP se realiza un TP bipulmonar o un TCP.



1.6.5. Indicaciones para realizar un TP pediátrico.

La indicación para la realización de un TP en individuos en edad pediátrica es la manifestación de HTP asociada a enfermedades cardiovasculares o anomalías pulmonares congénitas como enfermedad estructural cardíaca, estenosis de las venas pulmonares, enfermedad parenquimatosa, anomalías congénitas pulmonares y problemas de adaptación pulmonar a la vida extrauterina.

Al igual que en los pacientes adultos adultos, se debe optimizar el tratamiento médico, incluyendo los vasodilatadores y el oxígeno (O₂), antes de que el niño sea considerado como candidato a TP.

Desafortunadamente para estos pacientes no existen indicadores para su pronóstico debido a la diversidad de enfermedades incluidas en este apartado, pero los criterios empíricos para considerar un candidato a TP son:

- a) Deterioro de la enfermedad a pesar del tratamiento médico y/o quirúrgico correcto.
- b) Moderado o grave compromiso funcional (NYHA III-IV).
- c) Fallo ventricular derecho, cianosis importante o bajo gasto cardíaco.

En los casos donde la HTP es secundaria una anomalía en el desarrollo o a una enfermedad parenquimatosa pulmonar, se requiere de una valoración individual así como el tomar en cuenta si el paciente presenta hernia diafragmática congénita, deficiencia congénita de surfactante pulmonar proteína B o enfermedad pulmonar enfisematosa quística congénita, ya que no existen criterios específicos que indiquen si son candidatos a un TP.

Los niños que padecen de bronquitis obliterante, displasia broncopulmonar o FQ y que presentan disnea progresiva grado III-IV a pesar de tener tratamiento farmacológico, también son candidatos a un TP, sin embargo no se disponen datos sobre factores predictivos de supervivencia, por lo que se aplican los parámetros indicados para los pacientes adultos. En general, el tipo de TP que se les practica es el bipulmonar, a menos que el caso implique deformidad anatómica severa del tórax o cirugía previa que involucren un riesgo quirúrgico importante, se considera realizar TP unipulmonar para minimizar el riesgo de muerte⁽⁴⁶⁾.



1.7.-Contraindicaciones para realizar el TP.

Para realizar un TP existen contraindicaciones absolutas que indican situaciones en las cuales no es justificado el realizar este procedimiento, relacionadas a características generales del receptor como la morbilidad y la edad entre otras y contraindicaciones relativas en las que el trasplante podría llevarse a cabo a pesar de la comorbilidad asociada más la valoración propia del paciente descartando la posibilidad lesionar otros órganos y del criterio del médico tratante:

1.7.1. Contraindicaciones absolutas^(32,33,41):

- *Insuficiencia de otro órgano.* Particularmente alteración renal con un aclaramiento de creatinina inferior a 50mg/ml/min, dado el impacto negativo de la medicación inmunosupresora sobre la función renal y enfermedad coronaria intratable o disfunción ventricular izquierda, que debe considerarse apto para un TPC y no un TP bipulmonar.
- *Enfermedad neoplásica o maligna en los últimos dos años.* A excepción de los epitelomas basocelulares. Para las neoplasias renales, cáncer de mama grado II o superior, el cáncer de colon en grado superior al A de Dukes, y el melanoma grado III o superior el período libre de enfermedad deberá ser superior a 5 años.
- *Infección crónica extrapulmonar.* Hepatitis B antígeno positivo, Hepatitis C con daño hepático demostrado histológicamente, infección por VIH.
- *Deformidad severa de la caja torácica o de la columna vertebral y cualquier enfermedad musculoesquelética que afecte al tórax.* Como la cifoescoliosis severa. Cualquier enfermedad progresiva neuromuscular es contraindicación absoluta.
- *Imposibilidad de cumplir con el tratamiento o seguimiento post-operatorio.*
- *Enfermedad psiquiátrica o psicológica intratable que impida la medicación adecuada.*
- *Adicción a sustancias tóxicas activa en los últimos 6 meses.* (alcoholismo, farmacodependencia o tabaquismo).



1.7.2.-Contraindicaciones relativas^(32,33,41):

Sin olvidar tener en cuenta la comorbilidad y la edad del paciente, se debe considerar:

- *Tratamiento con esteroides.* Ocasionalmente ocasionan problemas en el manejo postoperatorio (necrosis avascular, osteoporosis, diabetes, hipertensión, miopatías), si se han usado durante años. Se considera óptima una dosis inferior a 20mg/día de prednisolona o prednisona.
- *Estado nutricional.* Se debe corregir todo peso corporal que esté por debajo del 70% y/o superior al 130% del ideal, dado que es un importante predictor de la supervivencia.
- *Problemas médicos que no hayan desembocado en un fallo orgánico para ser considerados contraindicación absoluta pero que sí añaden un riesgo mayor al manejo post-quirúrgico.* Diabetes mellitus, hipertensión arterial, úlcera péptica, reflujo gastro-esofágico y/o enfermedades del colágeno.
- *Osteoporosis sintomática.* Realizar siempre una densitometría ósea. Previo al trasplante se debe tratar cualquier problema metabólico óseo, tanto en los pacientes con enfermedad sintomática como asintomática.
- *Situación clínica inestable.* Ventilación invasiva, membrana de circulación extracorpórea, colonización bacteriana, micótica y/o por micobacterias multiresistentes.

1.8. Selección del receptor.

Para la inclusión de un paciente en la lista de espera del programa de trasplante pulmonar, se requiere de una evaluación exhaustiva del mismo, poniendo principal atención en las pruebas del funcionamiento del sistema cardiovascular. Es importante conocer el estado de los órganos principales y del sistema inmunológico, metabólico, de coagulación, etc. así como los sistemas psico-sociales. Con los resultados obtenidos, asociado al criterio de indicaciones y contraindicaciones para la realización del TP se realiza la valoración global para incluir al paciente como un candidato al procedimiento⁽⁴²⁾.



1.8.1. Exámenes y pruebas de laboratorio que se deben realizar al paciente potencial receptor de TP.

Los estudios básicos o de rutina deben ser realizados en todos los pacientes en el hospital de origen para obtener la información sobre los factores pronósticos de la enfermedad y de la comorbilidad asociada. En los centros de TP solo se realizarán las pruebas específicas complementarias o las que supongan un alto riesgo para el paciente⁽⁴⁷⁾:

- Hemograma, coagulación y bioquímica general.
- Proteinograma y aclaramiento de creatinina (orina de 24 h).
- Grupo sanguíneo. Anticuerpos irregulares y citotóxicos.
- Antígenos de histocompatibilidad (HLA) y poblaciones linfocitarias.
- Serología completa, parásitos en heces y Mantoux.
- Cultivo y antibiograma de esputo, orina y nasofaríngeo.
- Radiografías (Rx) AP y lateral de tórax.
- Tomografía computadorizada toraco-abdominal de alta resolución.
- Pruebas funcionales respiratorias completas.
- Gammagrafía de ventilación-perfusión.
- Test de esfuerzo estandarizado: 6 min de marcha.
- Electro y ecocardiograma.
- Ecocardiografía de estrés o coronariografía en pacientes con alto riesgo de enfermedad coronaria y en mayores de 55 años.
- Metabolismo óseo.

El número de posibles receptores de TP es superior a la oferta de donantes, por lo que se han elaborado una serie de guías internacionales, con el fin de acondicionar los recursos existentes a los candidatos más óptimos^(47,48).

El tiempo medio de espera en lista para TP a nivel internacional es de 1 a 2 años, por lo que los posibles candidatos deben cumplir una serie de condiciones generales y específicas de su enfermedad de base, factores de peor pronóstico, que justifiquen un TP antes de 2 años⁽³²⁾.

1.8.2. Evaluación de la comorbilidad del receptor.

Como ya hemos mencionado, para tomar una decisión de inclusión del paciente a la lista de espera, ya se debieron haber agotado todos los tratamientos posibles, incluyendo a aquellos pacientes con lesión pulmonar aguda grave, en los que es raro que se considere como opción terapéutica al trasplante. Además de los estudios de gabinete y laboratorio de rutina que se practican al paciente, se debe realizar una evaluación de la comorbilidad y controlarla antes de que los pacientes estén en lista de espera.



Existen normativas internacionales con respecto a la edad del paciente que limitan la indicación para un TCP con un límite de 55 años, para el TP unilateral en 65 años y para el TP bilateral en 60 años⁽⁴⁹⁾.

<i>Tabla I: Comorbilidad en el receptor</i>			
<i>Respiratoria</i>	<i>Cardiovascular</i>	<i>Efectos secundarios del tratamiento</i>	<i>Otros</i>
<i>Infecciones</i>	<i>Enfermedad Coronaria</i>	<i>Corticoides</i>	<i>Infecciones no respiratorias</i>
<i>Carcinoma broncogénico</i>	<i>Fallo ventricular izquierdo</i>	<i>Inmunosupresores</i>	<i>Alteraciones digestivas en la FQ</i>
<i>Cor pulmonale</i>	<i>Hipertensión arterial</i>		<i>Reflujo gastrointestinal</i>
<i>Neumotórax</i>	<i>Accidente vascular</i>		<i>Úlcera péptica</i>
<i>Embolismo pulmonar</i>			<i>Enfermedad diverticular</i>
			<i>Osteoporosis</i>
			<i>Malnutrición</i>
			<i>Problemas psico-sociales</i>

1.9. Selección del donante.

La escasez de los órganos donados para realizar diversos tipos de trasplantes, es el factor principal que provoca el desbalance entre la oferta y la demanda y que frena el desarrollo de esta alternativa médica. Esta situación se encuentra condicionada a ideas religiosas, culturales y legales que han influido en la actitud de la población para la donación. Por otro lado, la falta del entrenamiento de los médicos para la identificación de un donante potencial y del equipamiento necesario para extracción, preservación y mantenimiento de los órganos en condiciones adecuadas es otro factor importante.

Se estima que en el caso de los donantes multiorgánicos, solo el 10-15% tienen pulmones aceptables para TP, debido a la dificultad para prevenir el daño pulmonar asociado a la muerte cerebral o por agresiones al tejido como consecuencia de una intubación endotraqueal o de la ventilación mecánica que además favorece el desarrollo de infecciones. Por otra parte, existen actualmente conflictos de detalles entre la preservación de los pulmones y de otros órganos que ya se encuentran generalizados como es el caso de los riñones⁽⁵⁰⁻⁵²⁾.

En España, la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) y las Organizaciones Autonómicas de Trasplante centralizan y coordinan todo el proceso de donación y los equipos de trasplante son los encargados de valorar las características de



los donantes y decidir su validez en función de los criterios clásicos para considerar un donante como ideal y son⁽⁵³⁾:

1. Edad < 55 años.
2. Compatibilidad de grupo sanguíneo ABO.
3. Rx normal de tórax.
4. Oximetría arterial > 300mmHg con FiO₂ de 1.0 y PEEP de 5cm de H₂O durante 5 minutos.
5. Fumador de menos de 20 paquetes por año.
6. No evidencia de sepsis o broncoaspiración.
7. Ausencia de secreciones purulentas en la broncoscopía.
8. Ausencia de gérmenes en el cultivo y en la tinción de gram del esputo.
9. Ausencia de patología pulmonar previa.
10. Sin antecedentes de cirugía cardiopulmonar.
11. Ausencia de traumatismo torácico.

Se han adoptado otras medidas con el afán de compensar la escasez de los donantes pulmonares, con posibilidad de obtener los órganos procedentes de donantes a corazón parado, obtención de lóbulos pulmonares de individuos genéticamente emparentados y se está estudiando la posibilidad de xenotrasplantes para su aplicación en el futuro⁽⁵⁴⁻⁵⁹⁾.

Por lo anterior, los pulmones para trasplante pueden obtenerse de varios tipos de donantes:

1. *Donante cadáver*. Son todos los donantes en los que su fallecimiento se ha diagnosticado y certificado con base en el cese de las funciones encefálicas o cardiorrespiratorias. Se clasifican en:
 - Donante en muerte cerebral
 - Donante en asistolia
2. *Donante vivo*. Se refiere a aquella persona que efectúe una donación en vida de aquellos órganos, o parte de los mismos de los que su función pueda ser compensada por el organismo propio del donante de forma adecuada y segura, por lo que ésta donación es compatible con la vida.

1.9.1. Donantes en muerte cerebral.

Se define como muerte cerebral al cese irreversible de la actividad de ambos hemisferios cerebrales y del tronco encefálico. Los sistemas vitales cardiovascular y respiratorio se mantienen, en este caso, por medio de apoyo artificial^(63,64).



La legislación española contempla y regula esta situación en la Ley 30/1979, de 27 de Octubre, que en su artículo 10 dice: “*Los órganos para cuyo trasplante se precisa la viabilidad de los mismos, sólo pueden extraerse del cuerpo de la persona fallecida previa comprobación de la muerte cerebral, basada en la constatación y concurrencia, durante 30 min al menos, y la persistencia 6 h después del comienzo del coma, de los siguientes signos: a) ausencia de respuesta cerebral con pérdida de conciencia, b) ausencia de respiración espontánea, c) ausencia de reflejos cefálicos, con hipotonía muscular y midriasis y d) electroencefalograma plano demostrativo de inactividad bioeléctrica cerebral. Los citados signos no serán suficientes ante situaciones de hipotermia inducida artificialmente o de administración de sustancias depresoras del sistema nervioso central*”.

El 5 de Enero del 2000 entró en vigor el Real Decreto 2.070/1999 de 30 de diciembre por el que se regulan las actividades de obtención y utilización clínica de órganos humanos y que modifica algunos aspectos de la Ley anteriormente citada. Como aportaciones fundamentales, el nuevo Real Decreto contempla y define la figura del donante vivo y la del donante a corazón parado y amplía el uso de las pruebas para el diagnóstico de muerte cerebral como la arteriografía de cuatro vasos.

1.9.1.1. Selección del donante en muerte cerebral.

Una vez que se ha diagnosticado y certificado la muerte cerebral y contando con la aceptación familiar con las autorizaciones legales para la donación, la ONT informa de los datos clínicos y antropométricos del donante al Centro de Coordinación de Trasplantes del hospital⁽⁶⁰⁾.

Es primordial considerar si el pulmón donante es funcionalmente válido, ya que los problemas de mantenimiento y de preservación del órgano están íntimamente relacionados a la funcionalidad del órgano, con la evolución del paciente que lo recibe e influyen de manera directa en la morbilidad y mortalidad⁽⁶¹⁻⁶⁵⁾.

Para considerar óptimo a un donante pulmonar, de preferencia éste no debe presentar ninguna contraindicación para la donación^(66,67). Sin embargo, cada caso de donación debe ser evaluado de manera particular; ya que algunas contraindicaciones pueden tener cierta flexibilidad como por ejemplo el límite de edad; que se ha relacionado como un factor significativo de riesgo importante para el TP, pero si se comprueba que el pulmón tiene una funcionalidad óptima; se considera a éste tipo de pacientes como donantes subóptimos^(61,68). En cualquier caso, siempre se debe de ofrecer al paciente receptor el mejor pulmón posible e informarle sobre las limitaciones que existen.



Las contraindicaciones que no debe presentar un candidato a donador son:

1. Edad > 60 años.
2. Secreciones purulentas.
3. Rx de tórax con condensaciones.
4. $PO_2 < 300\text{mmHg}$
5. Fumador de más de 20 paquetes por año
6. Enfermedad infecciosa o ADVP
7. Trauma torácico severo
8. EPOC o cirugía torácica previa
9. Enfermedad neoplásica

También debe tomarse en cuenta en el momento de la valoración pulmonar que la muerte cerebral produce un deterioro progresivo de la función pulmonar debido a la liberación masiva de catecolaminas que provocan la pérdida de la integridad de la membrana alvéolo-capilar, permitiendo el paso de la albúmina y otras macromoléculas hacia el alvéolo; mecanismo que induce la formación de edema pulmonar neurogénico (EPN)⁽⁶⁷⁾, por lo que el donante debe mantenerse “seco” y vigilar que la presión venosa central (PVC) esté por debajo de los 10cm de H₂O. Desafortunadamente esto entra en conflicto con las indicaciones para el mantenimiento de otros órganos como el riñón en los que se prefiere mantener al máximo el flujo sanguíneo y la diuresis.

1.9.2.- Donantes en asistolia

Los primeros pulmones obtenidos para realizar el TP eran de donantes en asistolia, hasta que en 1979 se promulgó en España la ley de Trasplantes que reconoce a los donantes cadáveres en muerte cerebral.

La ventaja de la utilización de los pulmones obtenidos de donantes en muerte cerebral frente a los obtenidos en donantes en asistolia es que la viabilidad de los órganos, así como la técnica para su obtención es más sencilla. Esto hizo que en un principio el programa de donantes en muertes en asistolia fuera reemplazado, Sin embargo; debido a la demanda de los órganos para trasplante ha renovado el interés en éste tipo de donantes^(68,69).

Pero fue hasta el año 1995, en el *The first international workshop in non-heart-beating donors* en Maastrich, donde se registraron los aspectos técnicos, éticos y legales que debían presidir este programa de extracción, se acordó construir un banco internacional, con la información de los resultados del trasplante utilizando estos donantes y se estableció la clasificación de los donantes en asistolia^(32,33,71):



Donantes no controlados:

- I. Ingreso del cadáver.
- II. Resucitación infructuosa.

Donantes controlados:

- III. A la espera de paro cardíaco (incluye los casos en los que se decide desconectar la ventilación artificial).
- IV. Paro cardíaco de un donante en muerte cerebral

En ese mismo año, la ONT celebró en Madrid la *Reunión Nacional de Consenso sobre donantes de órganos a corazón parado*, en donde se produce como resultado la modificación a la ley de trasplantes, en donde se regulan las actividades de obtención y utilización clínica de órganos humanos, validando la obtención de órganos de donantes en asistolia, siempre que se puedan aplicar procedimientos de preservación de los mismos, en la persona fallecida. Permitiendo la inmediata autorización judicial para la obtención de los órganos, con lo que se agiliza la logística necesaria para dar eficacia a este procedimiento de extracción y que fue publicada en el Real Decreto 2070 del 30 de diciembre de 1999^(32,33,71).

En España, con el fin de obtener más donantes y solventar un poco la problemática de la demanda de órganos, se iniciaron los programas de donantes en asistolia en el Hospital Clínico San Carlos (HCSC) de Madrid con un programa de extracción renal y hepática a partir de “donantes controlados” en 1989, y de donantes “no controlados” en 1995 obteniéndose buenos resultados, sobre todo con los trasplantes renales⁽⁷²⁾.

En junio del 2002, el equipo de TP del Hospital Universitario Puerta de Hierro (HUCPH) iniciaron un programa de extracción pulmonar en este tipo de donantes en donde incluyeron una fase pre-clínica de evaluación funcional de los pulmones, donde se revisa la viabilidad macroscópica, funcional e histológica de los injertos pulmonares evaluados, se sistematizó la metodología de la preservación y evaluación funcional, así como la coordinación de los distintos equipos participantes⁽⁷²⁾.

1.9.3.-Donantes vivos

Los donantes vivos son aquellos individuos a los que se les extrae un lóbulo pulmonar y que se implantará en alguna persona relacionada genéticamente con ellos, generalmente los receptores son niños o adolescentes en lista de espera y que su situación clínica empeora rápidamente y que no es posible que se obtenga el órgano de un cadáver en un tiempo corto⁽⁸⁰⁾.

El porcentaje anual de este tipo de trasplantes es mínimo y se realiza en pocos centros debido a las siguientes condiciones:



- Si el trasplante indicado es lobar bilateral, se necesita de dos donantes vivos. Al implicar a tres personas en este procedimiento; la posible morbilidad y mortalidad se triplica.
- Si la cirugía es programada se necesitan tres equipos quirúrgicos simultáneos
- Problemas éticos, sobre la decisión de los familiares.

1.9.4 Mantenimiento y cuidados del donante.

Como ya mencionamos, la muerte cerebral desencadena una serie de alteraciones que son consecuencia de la liberación de catecolaminas, liberación de histamina, de hormonas y de otras sustancias que deben corregirse para el correcto mantenimiento de los diferentes órganos hasta el momento de su extracción. Además se requiere de la monitorización y cuidados para evitar la aparición de alteraciones hemodinámicas, la disregulación térmica y otras alteraciones endocrino-metabólicas que son resultado del cese de la respiración espontánea y que repercutirán en el éxito o el fracaso del trasplante⁽⁶⁷⁾.

Se sabe que el pulmón es el órgano que más rápidamente se degrada tras la muerte cerebral, por lo que el donante debe considerarse como un paciente en estado crítico, por lo que debe ser monitorizado de forma amplia, continua y deben aplicarse los cuidados en la Unidad de Medicina Intensiva (UMI), incluyendo en las etapas de extracción, preservación y preparación hasta el momento de ser implantado⁽⁷³⁾.

Los principios para el cuidado del donante son:

- ❖ Mantenimiento de la estabilidad hemodinámica. Hematocrito superior al 30%
- ❖ Perfusión adecuada de los órganos vitales. Presión arterial media mayor de 70 mmHg y una diuresis superior a 1 cc/kg/h
- ❖ Oxigenación tisular adecuada. Gasometría con FiO₂ del 40%.
- ❖ Corrección de los desbalances hidroelectrolíticos y sanguíneos. No debe hidratarse de manera excesiva.
- ❖ Mantenimiento de la normotermia.
- ❖ Prevención de infecciones.

1.10. Compatibilidad donante-receptor.

Una vez que se ha obtenido el pulmón y que se ha comprobado su viabilidad para el trasplante y que se ha seleccionado al candidato para la lista de espera, se deben considerar una serie de criterios para determinar que paciente es el adecuado para la recepción de ese pulmón^(67,74):



- ✓ *El receptor debe de ser compatible en grupo sanguíneo ABO.*
- ✓ *Se debe determinar a partir de los datos antropométricos si el pulmón tiene el tamaño adecuado a la caja torácica del receptor. Un pulmón demasiado grande podría impedir el cierre de la toracotomía o provocar un taponamiento cardíaco por compresión. Si la situación del receptor es de carácter urgente, se puede practicar una reducción del volumen del pulmón para ajustar su tamaño⁽⁸¹⁾.*

Para estandarizar el tamaño del pulmón con respecto a la caja torácica del receptor, se utiliza la correlación de la edad, sexo y estatura con el cálculo de la CV teórica^(67,83):

- ❖ *CV hombres = (0,0600 x altura en cm)-(0,0214 x edad en años) - 4,650*
- ❖ *CV mujeres = (0,0491 x altura en cm)-(0,0216 x edad en años) - 3,590*

Solo se utilizarían pulmones de mayor tamaño con respecto a la caja torácica del receptor en trasplantes unipulmonares. En éstos se recomienda que el pulmón tenga una CV teórica 1,2 a 1,5 veces mayor que el receptor⁽⁶⁶⁾.

1.11. Resultados del TP

La finalidad de realizar un TP o un TCP es la de prolongar la vida del paciente con una buena calidad de la misma. Estos conceptos se evalúan al obtener los resultados después de la técnica quirúrgica y van directamente correlacionados al tipo de trasplante realizado, a las complicaciones de infección o rechazo, a la respuesta individual ante el tratamiento inmunosupresor y aunque en menor proporción; a la experiencia del grupo que realiza el trasplante.

El compromiso y la responsabilidad del paciente de estar atento a ante cualquier síntoma y de que continúe su tratamiento también juega un papel importante; ya que debe haber comprendido perfectamente su nueva situación⁽⁷⁵⁾.

1.11.1. Supervivencia

De acuerdo con los datos del registro de la *The International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT), el índice de supervivencia media se sitúa en un promedio de 5,3 años⁽¹⁵⁾. La supervivencia no ajustada y sin especificar el tipo de trasplante pulmonar es del 88% a los 3 meses, 79% al año, 63% a los 3 años, 52% a los 5 años y 29% a los 10 años. Sin tener en cuenta otros datos, el trasplante bipulmonar es el que registra resultados a largo plazo superiores, ya que registra una supervivencia media de 6,6 años con respecto al trasplante unipulmonar; que registra una supervivencia de 4.6 años.



En cuanto a la supervivencia en función al tipo de padecimiento del paciente candidato al TP; los que padecen de FQ obtienen el mejor resultado global con una supervivencia media de 7,1 años; los pacientes con HTP idiopática de 4,9 años. No obstante, los resultados condicionados a la supervivencia del primer año; el paciente con HTP se equipara con el de FQ; con una supervivencia media de 9,3 años mientras que los pacientes de EPOC y FP idiopática presentan una supervivencia media de 6,6 y 6,7 años. Estos resultados están relacionados con la edad del paciente al momento del trasplante.

1.11.2.-Calidad de vida

Desafortunadamente no se disponen de parámetros de evolución de la calidad de vida, pero la limitación física para las actividades habituales y el desempeño de una actividad laboral se utilizan como indicativos. El 80% de los receptores no muestran limitaciones en su actividad diaria al año de efectuarse el trasplante, el 14% realizan sus tareas cotidianas con algo de ayuda y sólo el 4% las efectúan con total dependencia.

Sin embargo, debido a la frecuencia necesaria de los controles médicos, hospitalizaciones continuas y la aparición de algunas complicaciones provoca que el porcentaje de los pacientes que realizan vida laboral sea bajo y en el caso de los niños que regresan a la escuela, el rendimiento es bajo comparado con el de sus compañeros^(77,78). De éstos pacientes, el 45% no requieren hospitalización durante el primer año, un 24% son hospitalizados por infecciones y un 17% se hospitalizan por rechazo.

Otras complicaciones que son frecuentes entre el periodo de uno a los tres años post-trasplante son la hipertensión arterial de causa renal (45% y 62%), disfunción renal (20% y 22%), hiperlipidemia (8% y 16%), diabetes (15% y 13%) y neoplasias, (principalmente linfoma 5% y 3%)⁽⁷⁷⁾.

La evolución funcional después del TP uni o bilateral ha mejorado en los últimos años; se ha registrado mejoría de los parámetros ventilatorios entre los 3 y 6 meses postrasplante y una disminución en el tiempo de recuperación postquirúrgica inmediata, la hipoxemia y la hipercapnia se corrigen más rápidamente y la capacidad de soportar el ejercicio mejora de tal forma que los pacientes pueden realizar una vida activa prácticamente normal⁽⁷⁹⁾.

1.12. Complicaciones en el TP.

Las complicaciones pueden aparecer en el periodo postoperatorio inmediato y se les considera como precoces, otras pueden aparecer a lo largo del tiempo y se les considera como tardías. Algunas pueden ser consecuencia del acto quirúrgico, otras son



derivadas del órgano trasplantado, también pueden deberse al proceso de adaptación del organismo a su nuevo injerto o son secundarias al tratamiento inmunosupresor.

1.12.1. Complicaciones precoces.

Las complicaciones precoces más frecuentes las podemos clasificar de la siguiente manera:

- **Atribuibles al acto quirúrgico.**- Neumotórax y fuga de aire persistente, derrame pleural, hemorragia, dehiscencia o estenosis bronquial, estenosis vasculares, lesiones nerviosas, alteraciones de la herida quirúrgica.
- **Pulmonares.**- Fracaso agudo del injerto, rechazo agudo del injerto, edema de reperfusión.
- **Infeciosas.**- Pleurales, pulmonares y extrapulmonares, otras.
- **Generales.**- Inestabilidad hemodinámica o hipotensión, HTP, arritmias cardíacas, fallo renal agudo, tromboembolismo pulmonar, coagulopatía con diátesis hemorrágica, miopatía, complicaciones abdominales, procesos linfoproliferativos.

1.12.1.1. Atribuibles al acto quirúrgico.

Neumotórax y fuga de aire persistente: Las causas de ésta complicación pueden ser pequeñas lesiones durante el despegamiento del bloque pulmonar al momento de la extracción del injerto, bullas subpleurales y dehiscencias a nivel de la sutura bronquial. El tratamiento indicado debe ser inicialmente conservador, manteniendo el sello de agua por un periodo de tiempo más largo. Raras ocasiones se requiere de una corrección quirúrgica⁽⁸⁰⁾.

Derrame pleural (DP): Se relaciona con una mayor permeabilidad capilar y con déficit del drenaje linfático del injerto. Este exudado seroso generalmente va disminuyendo durante los primeros diez días. El tratamiento consiste en mantener el drenaje pleural hasta obtener < de 80ml de exudado/día.

Hemorragia: Si ocurre dentro de las primeras horas post-trasplante y es de magnitud que provoque alteración de la estabilidad hemodinámica o restricción respiratoria, requiere una re-exploración quirúrgica. Esta complicación se asocia al aumento del índice de la morbilidad y mortalidad post-operatoria^(81,82).



Estenosis bronquial: Puede ocurrir en fase temprana o tardía del postoperatorio. Se atribuye a la isquemia de la mucosa por la pérdida de la irrigación de las arterias bronquiales. Esta anomalía se puede evaluar mediante una fibrobroncoscopia o una tomografía. Su tratamiento consiste en efectuar dilataciones endoscópicas o colocar stents intraluminales⁽⁸³⁻⁸⁵⁾.

Estenosis vasculares: Se presentan en aproximadamente el 29% de los pacientes trasplantados y son diagnosticadas por medio de la ecografía transesofágica. El grado de estenosis repercute en la evolución clínica del paciente a corto plazo:

- ✓ Estenosis venosa. Los signos clínicos son inespecíficos y si la estenosis es completa, el infarto pulmonar se produce en un plazo de 4-6 horas. Radiográficamente se puede observar un infiltrado difuso, que hay que diferenciar con otras patologías como infección, RA o LIR. Como tratamiento se han reportado resultados aceptables con un activador del plasminógeno; sin embargo si se detecta que la obstrucción significativa, es preciso repararla con angioplastia o cirugía, y en ocasiones la única opción terapéutica es la lobectomía o el retrasplante.
- ✓ Estenosis arterial. Es poco frecuente y la terapéutica de elección es similar a la que se emplea para la estenosis venosa. El diagnóstico se realiza por una ecografía transesofágica o angiografía y aunque se puede intentar el tratamiento con dilatación neumática y endo-prótesis, con frecuencia requiere corrección quirúrgica^(86,87).

Lesiones nerviosas: Los nervios frénicos pueden lesionarse durante las maniobras de despegamiento del pulmón nativo, principalmente en aquellas patologías supurativas crónicas que han formado adherencias pleurales. Esto ocasiona como consecuencia una mala mecánica de ventilación del paciente que dificultará el periodo de retiro del respirador. Otra lesión común es la del nervio recurrente izquierdo a la disección del hilio homolateral, este nervio no tiene repercusión en la función ventilatoria, pero su lesión provoca disfonía por parálisis de la cuerda vocal izquierda⁽⁸⁶⁾.

Alteraciones de la herida quirúrgica: A pesar de la inmunosupresión a la cual está sometido el paciente, las alteraciones en la herida quirúrgica se observan con poca frecuencia:

- ✓ Mala fijación del esternón. Produce dolor por secundario a la movilización de la zona de la esternotomía, altera la mecánica ventilatoria y en casos extremos puede llegar a producir una dehiscencia y desplazamiento del mismo.



- ✓ Osteomielitis del esternón. Añade inestabilidad y además de alteraciones de ventilación, existe un alto riesgo de mediastinitis.

Por lo anterior, se deben respetar las medidas de asepsia, disminuir en lo posible la devascularización excesiva y asegurar una buena fijación del esternón⁽⁸⁶⁾.

1.12.1.2. Pulmonares.

Fracaso agudo del injerto: Es el término utilizado para referirse al fallo de la función y deterioro de la función del injerto recién implantado^(88,89). Se presenta dentro de las primeras 72 horas de vida y no se conoce su etiología, cursa de forma similar al edema de reperfusión y no tiene buena respuesta al tratamiento. A éste se le atribuye el 30% de la mortalidad postoperatoria temprana^(90,91).

Rechazo agudo (RA): Es una de las complicaciones más frecuentes en los pacientes trasplantados y se generalmente presenta dentro de los primeros 3 meses, aunque puede desarrollarse en cualquier momento de la vida del receptor. La manifestación clínica es muy inespecífica, ya que podemos tener desde pacientes asintomáticos hasta los que presentan disnea, tos y fiebre y con radiografías de tórax que pueden estar sin alteraciones radiográficas y otras en donde observamos signos de hipoxemia e infiltrados difusos con una espirometría que evidencia la caída de los volúmenes y que mejoran después de semanas de tratamiento^(92,93).

Se manifiesta por la expresión de una respuesta inflamatoria mediada por células, en donde los linfocitos del receptor reconocen al pulmón implantado como extraño. Se produce entonces una activación de los linfocitos T y éstos liberan citoquinas (especialmente IL-2), responsables de la proliferación de las células mononucleares y de la expresión de los HLA clase II en el endotelio y epitelio bronquial. Los HLA aumentan la superficie antigénica de las células del receptor potencializando así la reacción inmunológica⁽⁹⁴⁾.

El diagnóstico se realiza a través de una biopsia transbronquial (BTB). En los casos en los que no se pueda realizar un estudio histopatológico debido a la situación de compromiso respiratorio del paciente, se tratan los signos clínicos con dosis altas de prednisona (500mg/Bid/3días) y si no se observa mejoría dentro de las primeras 12 horas, se deben descartar otras causas etiológicas de los signos clínicos^(86,92,95).

En 1995 el *Lung Rejection Study Group* (LRSG) estandarizó una nomenclatura para el diagnóstico de RA basándose en el grado de infiltración linfocitaria. Este hallazgo no es patognomónico, por lo que se debe realizar un lavado broncoalveolar (LBA) con cultivo y estudio de la celularidad para descartar otros procesos patológicos como la neumonía por Citomegalovirus, *Pneumocystis Carinii*, enfermedad



linfoproliferativa postrasplante, problemas de preservación, zona de biopsias previas o posible recurrencia de la enfermedad primitiva como la sarcoidosis⁽⁹²⁾:

Tabla II: Grados de rechazo agudo (LMSG 1995)	
Grado A0	<i>No rechazo</i>
Grado A1	<i>Mínimo</i>
Grado A2	<i>Ligero</i>
Grado A3	<i>Moderado</i>
Grado A4	<i>Severo</i>

El tratamiento se instaura a partir del grado A2 y se basa en la administración de fármacos inmunosupresores como los inhibidores de la síntesis de IL-2 (ciclosporina A, Tacrolimus), agentes anti-mitóticos de soporte (azatioprina, micofenolato mofetil) y corticosteroides (iniciando con metilprednisolona y luego prednisona) a dosis altas durante los primeros 3 meses y posteriormente se van disminuyendo hasta alcanzar una dosis de mantenimiento.

Se ha reportado que algunos hallazgos histológicos como la presencia de linfocitos B, la presencia de tejido de granulación intraluminal y la expresión en las células mononucleares de los antígenos C494 y C219 asociados a los grados de rechazo A3 y A4 como factores predictores de la resistencia al tratamiento esteroideo. En estos casos se suele aplicar terapia citolítica (anticuerpos monoclonales OKT3, globulina antilinfocítica, globulina antitimocítica, daclizumab, basiliximab). Otros tratamientos poco comunes son la irradiación total linfocitaria y la fotoféresis^(92,96). A pesar de todo ello, aunque se resuelva el episodio de RA refractario, la incidencia de RC no se modifica. De hecho, la recurrencia de episodios de RA se ha relacionado directamente con el desarrollo de RC⁽⁹²⁾.

Edema de Reperusión: También conocido como edema de reimplantación, respuesta de reimplantación o daño de reperusión. Se le define como la alteración del parénquima pulmonar que consiste en un edema de baja presión por extravasación de líquido al espacio extravascular a consecuencia de la lesión de isquemia-reperusión (LIR) secundario al trasplante o bien a factores relacionados con la preservación del pulmón. También se cree que está influido por la interrupción del drenaje linfático en el pulmón implantado^(88,97,98).

También se asocia su incidencia con el aumento del tiempo de isquemia y con la circulación extracorpórea (CEC).



Cuando un tejido es sometido a un proceso de isquemia (LIR), se generan una serie de eventos que desembocan en la muerte celular; la anoxia provoca una disminución de los niveles de ATP, deteniendo el metabolismo energético, se activa entonces el metabolismo anaerobio para mantener los niveles de ATP, pero la célula sufre una degeneración del intercambio iónico y de membrana y termina en un proceso de apoptosis.

Radiográficamente lo observamos como un infiltrado alveolo-intersticial difuso asociado con la manifestación clínica de un deficiente intercambio gaseoso; que puede ser desde una hipoxemia leve hasta un cuadro de distrés respiratorio severo. Afortunadamente su incidencia ha disminuido notablemente con los nuevos líquidos de preservación con características de líquido extracelular, bajos en potasio (perfadex®)^(99,100).

Las medidas terapéuticas que se deben adoptar, con el fin de prevenir ésta complicación es adoptar un adecuado protocolo de extracción pulmonar reduciendo el tiempo de isquemia, limitando el aporte de líquidos excesivo en el proceso de implante y con una adecuada manipulación del injerto. Si el edema ya está establecido, las medidas deben de ir enfocadas a favorecer el balance hídrico negativo con la administración de diuréticos y catecolaminas, cuidando siempre de la función renal. Con éstas medidas de soporte, el edema suele resolverse en un periodo de 36 a 72 horas^(86,88).

1.12.1.3. Infecciosas.

Pleurales: Se trata del empiema pleural y presenta una baja incidencia del 3-5%, probablemente asociada con la profilaxis antibiótica la vigilancia radiológica y los cuidados de los drenajes pleurales, con evacuación precoz de las colecciones líquidas. Sin embargo, cuando ésta complicación aparece, se asocia con mortalidad importante⁽⁷⁵⁾. Suele producirse en los trasplantes bipulmonares favorecido por la incisión de “clam-shell”, que permite la comunicación entre ambas cavidades pleurales y por la presencia de dehiscencias de la anastomosis bronquial y el mantenimiento prolongado de los tubos de drenaje. Como en cualquier otro empiema, el tratamiento consiste en administrar un adecuado tratamiento de antibióticos y en mantener drenada correctamente a la cavidad pleural^(80,86,101).

Pulmonares y extrapulmonares: El pulmón; al estar en contacto con el exterior es más susceptible a la agresión de los agentes externos, por lo que las infecciones son dos veces más frecuentes en receptores pulmonares que en receptores de corazón e hígado y se estima que constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad postoperatoria del TP. Esta puede ser adquirida desde el pulmón donante, desde el pulmón nativo contralateral en el caso de los trasplantes unilaterales o desde los senos



paranasales y/o las vías aéreas superiores, además de los factores de la exposición exterior y los que favorecen a la infección como la inmunosupresión, la denervación del pulmón trasplantado con depresión del reflejo tusígeno y abolición del reflejo mucociliar, y la interrupción del drenaje linfático⁽⁸⁶⁾.

Según el germen causal pueden clasificarse en:

✓ Bacterianas.

La neumonía bacteriana es la infección más frecuente y aparece hasta en un 66% de los pacientes con TP y generalmente aparece dentro de las primeras dos semanas después de la cirugía. Con tratamiento adecuado de antibióticos durante los primeros 10 días post-trasplante, la cifra de los pacientes afectados puede reducirse hasta en un 10%.⁽¹⁰²⁾ Los gérmenes aislados con mayor frecuencia son la *Pseudomona aeruginosa*, el *Staphylococcus aureus* y el *Haemophilus influenzae*⁽¹⁰³⁾.

Otra infección tuberculosa es rara, pero es más común que se presente en la población de TP, por lo que sería necesario realizar en éstos pacientes la quimioprofilaxis adecuada durante 9 a 12 meses con el fármaco adecuado⁽¹⁰⁴⁾.

La bronquitis bacteriana representa el 25% de las infecciones en los pacientes trasplantados y es más frecuente en aquellos que padecen de FQ y es favorecida cuando el paciente es portador de una prótesis endobronquial o por un RC, contribuyendo al desarrollo de bronquiectasias en la BO⁽¹⁰⁵⁾.

La mediastinitis es una grave complicación, que aparece con mayor frecuencia tras disecciones amplias del mediastino como en los TCP o cuando aparecen dehiscencias de la anastomosis respiratoria. También, aunque en raras ocasiones aparece como a una osteomielitis esternal⁽⁸⁶⁾.

✓ Virales.

La infección por *Citomegalovirus* (CMV) es la segunda infección más frecuente en el paciente con TP, generalmente se manifiesta de 1 a 4 meses tras el TP y no todos los pacientes infectados desarrollan la enfermedad⁽¹⁰⁶⁾. Su incidencia y prevalencia está relacionada directamente con el estado serológico del receptor y del donante, y del tratamiento inmunosupresor. La neumonía es la manifestación más común de ésta infección con signos de fiebre, tos, deterioro respiratorio e infiltrados difusos en la Rx, planteando muchas veces la necesidad de un diagnóstico diferencial con un RA. Sin embargo, también puede manifestarse de forma insidiosa como hepatitis, gastroenteritis, colitis, retinitis, o un cuadro generalizado con importante postración. El diagnóstico puede realizarse por serología, detección de virus en la BTB o en el lavado



broncoalveolar, y se ha asociado con una mayor incidencia de RC. El tratamiento con ganciclovir es el más eficaz y puede utilizarse como profiláctico a partir del día 10 postoperatorio^(107,108).

Otros virus que pueden afectar al paciente con TP son el Herpes; no presenta problemática excesiva debido a la eficacia del tratamiento con Aciclovir, el virus sincitial respiratorio, paramixovirus y el virus de *Epstein-Barr*. Este último se le ha asociado con procesos linfoproliferativos y relacionados al RC^(86,109-112).

✓ Micóticas

Este tipo de infecciones pueden ocurrir en el periodo postoperatorio temprano o tardío, las más frecuentes son las producidas por *Candida albicans* o *Aspergillus spp.*

La candidiasis neumónica es rara, pero si se produce puede ser fatal. Puede provocar mediastinitis, aneurismas micóticos e infección diseminada. El tratamiento es con fluconazol o anfotericina B.

La Aspergilosis aparece entre el 20% y 40% de los receptores pulmonares con una presentación clínica de la enfermedad en el 25-60% de los pacientes infectados. La variedad más comúnmente aislada es el *Aspergillus fumigatus* y se caracteriza por una bronquitis ulcerativa o pseudomembranosa, neumonía y también puede ser diseminada; provocando una estenosis del árbol respiratorio debida al proceso inflamatorio que produce y en su forma ulcerativa propiciar la aparición de una fístula broncoarterial con hemoptisis masiva y un mal pronóstico. El diagnóstico se realiza por fibrobroncoscopia, aislando el hongo de las lesiones ulcerativas y de las aspiraciones y el tratamiento es a base de itraconazol y anfotericina B y como tratamiento profiláctico se puede utilizar el fluconazol y aerosoles de anfotericina B⁽⁸⁶⁾.

✓ Otras infecciones.

La infección por *Pneumocystis carinii* supone un grave riesgo para los pacientes inmunodeprimidos. La mortalidad asociada a la neumonía por este germen es considerable y por ello es obligada la profilaxis con cotrimoxazol desde el día 15 posttrasplante y que ha demostrado una alta efectividad⁽⁸⁶⁾.

Finalmente, hay que tener en cuenta las enfermedades infecciosas según el área geográfica, por ejemplo en España se han reportado casos de Leishmaniasis en pacientes trasplantados⁽¹¹³⁾.



1.12.1.4. Generales.

Inestabilidad hemodinámica o hipotensión: Es frecuente sobre todo cuando hay sangrados importantes y al utilizar CEC debido a la disminución de las resistencias periféricas. En estos casos la necesidad de mantener balances hídricos negativos para minimizar el edema pulmonar por reperfusión agrava más el problema, por lo que es necesario realizar un balance hídrico estricto asociado a la administración de fármacos inotrópicos y vasoactivos. A los pocos días después de la cirugía los pacientes logran estabilizarse. Se ha relacionado con la liberación por parte de los leucocitos y plaquetas de citoquinas y otros factores humorales⁽⁸⁶⁾.

Hipertensión pulmonar: Puede ser producida tras la reestructuración de la hemodinámica del circuito pulmonar o por la implantación de pulmones más grandes que aumentan la presión intratorácica causando una alteración del retorno venoso. Se debe monitorear si los pacientes presentan elevaciones de las cifras de la presión arterial pulmonar durante las primeras 48 horas postrasplante, especialmente si presentan edema de reperfusión ya que esta hipertensión puede afectar al mantenimiento hemodinámico general del paciente y, en ocasiones es preciso emplear PGE₁ y NO⁽⁸⁶⁾.

Arritmias cardiacas: Las más frecuentes son las ventriculares como la fibrilación o el flutter auricular. Podrían estar relacionadas a la manipulación quirúrgica y a las suturas de la aurícula izquierda^(114,115).

Fallo renal agudo: Probablemente a causa de las variaciones del flujo plasmático renal al que es sometido el paciente durante el trasplante, sumado a la sobrecarga y a la toxicidad de los fármacos que estos pacientes requieren. En algunos casos puede ser necesario realizar diálisis transitoria hasta estabilizar al paciente⁽¹¹⁶⁾.

Tromboembolismo pulmonar (TEP): Es una complicación de gravedad extrema, y los pacientes con TP son considerados de alto riesgo para el desarrollo de trombosis venosa profunda. La profilaxis debe ser muy rigurosa a base de anticoagulantes de bajo peso molecular (heparina, henoxaparina) y maniobras físicas como la movilización y compresión elástica de las extremidades inferiores además de la vigilancia de los catéteres hasta el inicio de la deambulacion del paciente. Puesto que en el pulmón trasplantado no existe circulación bronquial, se ha estimado un 12% de incidencia de TEP en pacientes con TP y TCP con una mortalidad de hasta el 42%⁽⁸⁶⁾.

Coagulopatías: Aparecen con mayor frecuencia en aquellos pacientes que han tenido hemorragias importantes y/o sometidos a un mayor tiempo de CEC y que han requerido de politransfusiones debido al exceso del consumo de factores de coagulación. El tratamiento es de sostén, a base de la administración de plasma y de factores de la coagulación^(82,117).



Miopatía: Aparece al parecer como consecuencia de múltiples mecanismos, sin embargo se le ha relacionado sobre todo con el empleo crónico y/o a altas dosis de corticoides y al uso de los relajantes musculares. No se le considera una complicación seria y suele ser reversible a medio plazo tras reducir la dosis de esteroides. Cuando la miopatía postoperatoria es severa, los pacientes sufren de insuficiencia respiratoria crónica por una disfunción del metabolismo oxidativo del músculo-esquelético que persiste a pesar de la mejora en la oxigenación tras el TP, prolongando la necesidad de una larga ventilación mecánica que demora la recuperación del paciente, favorece las infecciones y ocasiona de forma indirecta una mayor morbilidad y mortalidad⁽⁸⁶⁾.

Complicaciones abdominales: Entre las comunes tenemos al íleo paralítico prolongado, la isquemia intestinal, la colitis, la perforación de colon y la colelitiasis. Son las responsables de hasta un 22% de las muertes postrasplante y, en el caso de perforación de colon, la mortalidad se incrementa hasta en un 50% a pesar del tratamiento quirúrgico. En pacientes con FQ, la incidencia de estas complicaciones es mayor y el cuadro más común que presentan es la obstrucción intestinal distal. Por ello, aunque no exista ingesta oral, deberá mantenerse un tratamiento a base de administración oral de enzimas pancreáticas a la mitad de la dosis habitual, asociado con agentes mucolíticos como la acetilcisteína⁽⁸⁶⁾.

1.12.2. Complicaciones tardías.

1.12.2.1. Procesos linfoproliferativos o neoplásicos.

Como ya hemos mencionado, éstos procesos han sido relacionados con el virus de *Epstein-Barr*, aunque su papel no está aún bien definido. Además se ven favorecidos por el tratamiento inmunosupresor. Se puede presentar como una proliferación policlonal de linfocitos lentamente progresiva hasta un proceso proliferativo monoclonal de alta malignidad. Este proceso suele no afectar al SNC y responde a la reducción del tratamiento inmunosupresor o extirpación de la masa en los casos en que el proceso esté localizado. También puede utilizarse quimioterapia convencional y aciclovir. En los casos de falta de respuesta, la supervivencia es inferior a 6 meses⁽⁸⁶⁾.

1.12.2.2. Rechazo crónico (RC) y Bronquitis obliterante (BO).

La BO es un proceso fibroproliferativo que provoca la obliteración de la vía aérea y la fibrosis del injerto, se le considera como la manifestación principal del RC y continúa siendo el talón de Aquiles para los pacientes receptores y los médicos especialistas en el TP, provocando una baja supervivencia a largo plazo en comparación con el trasplante de otros órganos sólidos. Su índice de incidencia dentro de los dos primeros años es alta, pero los pacientes que no la presentan permanecen siempre en



riesgo acumulativo del 60-80% entre los 5 y 10 años postrasplante representando así la principal causa de muerte de los pacientes con TP pasado el primer año de la cirugía⁽⁹⁶⁾.

Es indetectable en la fase-preclínica y no existe tratamiento satisfactorio. En su fase inicial, la enfermedad es de carácter insidioso, con disnea progresiva, tos y muchas veces se asocia con una colonización de la vía aérea por *Pseudomona aeruginosa* produciendo brotes recurrentes de bronquitis purulentas.

Su diagnóstico por medio de histopatología tiene una sensibilidad \leq al 17% y los hallazgos sugieren que existen dos procesos distintos allegados uno del otro; por una parte existe una inflamación de las estructuras bronquiolares de origen inmune y/o infeccioso que conduce a una respuesta fibroproliferativa de los bronquiolos y bronquio de la vía aérea de mayor tamaño con progresiva obstrucción y fibrosis del injerto y se le considera activa si se acompaña de infiltración linfocítica peribronquiolar o inactiva si la infiltración es escasa o ausente. Y por otro lado, los episodios previos de RA son el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la BO; además de la asociación con la neumonía citomegálica, la bronquitis linfocítica, la isquemia de la vía aérea y el sistema HLA entre el donante y el receptor^(92,118).

El hallazgo de la bronquitis linfocítica o de inflamación linfocítica no fibrosante, precedida por episodios de RA; debe alertar al clínico hacia un posible cambio de tratamiento inmunosupresor, ya que se le asocia a un incremento del riesgo para desarrollar BO.

Dada ésta problemática, se utiliza la caída del $FEV_1 \leq$ al 80% del pico obtenido después del trasplante sin causa no justificada para clasificar a la BO clínicamente:

Tabla III: Clasificación clínica de la BO	
Grado 0	$FEV_1 > 80\%$ del basal
Grado 1	$FEV_1 = 66-79\%$
Grado 2	$FEV_1 = 51-65\%$
Grado 3	$FEV_1 < 50\%$

Una vez establecido el diagnóstico, la enfermedad puede seguir un curso lento y progresivo o estacionarse, bien de forma espontánea o como respuesta al tratamiento que consiste en aumentar la inmunosupresión, pero no existen evidencias que hayan demostrado alguna eficacia. Se considera que es efectivo si se consigue ralentizar la caída de la función pulmonar o por lo menos estabilizarla, ya que la mejoría es poco probable^(92,119).



1.12.2.3. Toxicidad farmacológica.

Ésta depende de cada fármaco y paciente en particular. Los pacientes trasplantados deben recibir un tratamiento inmunosupresor de forma crónica, esto asociado a la inestabilidad hemodinámica propia del proceso de trasplante, aumenta la probabilidad de sufrir de infecciones, procesos linfoproliferativos y otros procesos adversos:

Tabla IV: Toxicidad farmacológica (inmunosupresores)	
Fármaco	Efectos adversos
<i>Ciclosporina</i>	<i>Hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, hipotricosis, hipertensión, temblor, hiperplasia gingival, fatiga, trastornos GI</i>
<i>Tacrolimus</i>	<i>Nefrotoxicidad, hipertensión, taquicardia, angina de pecho, leucopenia, trastornos GI, diabetes</i>
<i>Azatioprina</i>	<i>Hepatotoxicidad, mielosupresión, riesgo de neoplasias, vómito, náuseas</i>
<i>Micofenolato</i>	<i>Anorexia, gastritis, diarrea, leucopenia, aumento de FAS</i>
<i>Bloqueadores de IL-2</i>	<i>Nefrotoxicidad, edema periférico, hipercalcemia, cefalea, hipersensibilidad, trastornos GI</i>
<i>Esteroides</i>	<i>Síndrome de Cushing, diabetes, HTA, necrosis ósea, Retraso de la cicatrización, debilidad muscular, alteraciones del sodio, retención de líquidos, amenorrea, retraso del crecimiento, etc.</i>



2. La Terapia con Ozono

El ozono (O₃) es una molécula gaseosa inestable, natural, de olor agrio y está compuesto de tres átomos de oxígeno, generalmente es incoloro, pero en grandes concentraciones puede verse ligeramente azulado. Se encuentra de manera natural en la estratósfera y puede olerse durante las tormentas eléctricas; ya que la descarga de los rayos entre las nubes y la tierra, catalizan la formación de ozono a partir del oxígeno atmosférico.

2.1.-Descubrimiento del ozono y su historia en la medicina

El Ozono fue descubierto por Christian Friedrich Schönbein en 1840; mientras trabajaba con una batería de voltaje en presencia de oxígeno, apareció un gas de olor acre penetrante: una especie “súper-activa de oxígeno” que pensó que podía ser utilizado como desinfectante⁽¹²⁰⁾.

El químico Werner Von Siemens, dio a conocer el concepto de que el ozono se deriva del oxígeno; al inventar la súper inducción de tubo, que consta de dos electrodos interpuestos en una placa fija a una alta tensión, que en presencia de oxígeno podría generar una capa de ozono. Gracias a este descubrimiento, se hizo posible la fabricación del generador de ozono para su utilización. Actualmente los generadores de ozono se utilizan para usos industriales de desinfección del agua, ya que posee una potente actividad bactericida, sin embargo no se ha prestado la suficiente atención a las aplicaciones médicas⁽¹²⁰⁾.

Entre las primeras aplicaciones del ozono dentro del campo de la medicina fue para el tratamiento de la gangrena post-traumática en soldados alemanes durante la primera guerra mundial, que dio paso a la invención de un ozonizador médico fiable por el físico Joachim Hänsler, estimulado por la falta de antibióticos y por las propiedades bactericidas del ozono⁽¹²⁰⁾.

Posteriormente el dentista suizo E. A. Fisch fue el primero en utilizar el ozono, cuando tuvo que atender al cirujano E. Payr por una pulpitis gangrenosa, dándose cuenta de la eficacia del tratamiento con ozono en la cirugía. Sus resultados fueron informados en el 59th Congreso de la Sociedad Alemana de Cirugía en Berlín, en 1935; indicando que además es una terapia tolerable, con resultados positivos en el 75% de los pacientes, y que además el método de utilización es sencillo, higiénico e inocuo como algunas de sus ventajas⁽¹²⁰⁾.

En 1936, el médico francés P. Aubourg propuso el tratamiento vía rectal con O₃ para el tratamiento de la colitis crónica y las fístulas. Y el Dr. Payr fue el primero en



utilizar el tratamiento con O₃ vía intravenosa. Esta última vía de administración está prohibida en los Estados Unidos desde 1984, debido a que la administración de ozono directamente por vía IV se asocia al riesgo de provocar la muerte por embolismo gaseoso pulmonar; este hecho, aunado con la hipótesis de la toxicidad que provoca la exposición al ozono, ha influido negativamente para el desarrollo de la ozonoterapia⁽¹²⁰⁾.

2.2.-Propiedades físicas y químicas del ozono

Como ya se mencionó, la capa de ozono se encuentra en la estratosfera, aproximadamente a 22km de la superficie terrestre y puede alcanzar una concentración máxima de 10 partes por millón volumen (ppmv), equivalente a 10mcg/ml. Esta capa absorbe la mayoría de la radiación ultravioleta (menor a 290nm) emitida por el sol protegiendo los sistemas biológicos de la tierra⁽¹²¹⁾.

El ozono es una molécula gaseosa natural inestable, compuesta de 3 átomos de oxígeno, con una densidad de 2.140kg/m³ y una masa molecular de 47.998g/mol. Tiene una estructura cíclica con una distancia entre los átomos de oxígeno de 1.26 Å y existe en varios estados mesoméricos en equilibrio dinámico, con una solubilidad en agua de 0.105g/100ml⁽¹²¹⁾.

Es el tercer agente oxidante, después del flúor y el persulfato; formado de oxígeno puro sometido a muy altos gradientes de voltaje de un proceso endotérmico generado por los electrodos del tubo de siemens y su vida depende de la temperatura y presión atmosférica, lo que hace imposible su almacenamiento.

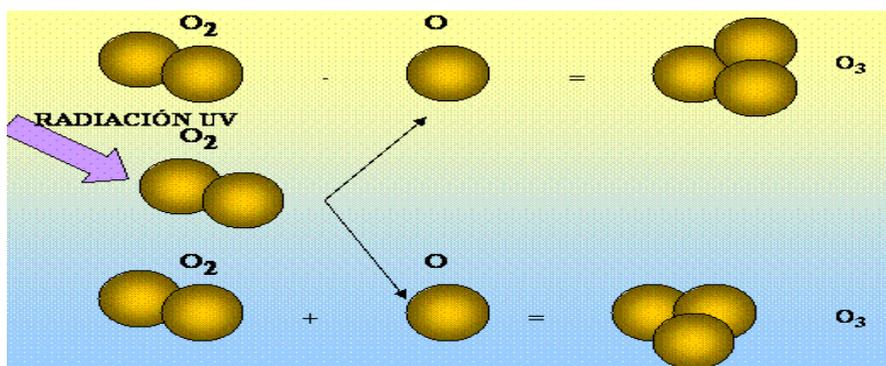


Fig. 1: Reacción natural de formación de ozono

2.3.-El ozono ambiental y su toxicidad

En la atmósfera terrestre; la radiación ultravioleta y las cianobacterias catalizaron la producción del ozono cuando el oxígeno ambiental comenzó a aumentar. El equilibrio de este mecanismo es constante; sin embargo, ha sido subvertido durante los últimos años debido al aumento progresivo de los contaminantes derivados de los



clorofluorocarbonados (CFCs) dispersados en el ambiente⁽¹²²⁾, provocando una destrucción excesiva del ozono y causando el adelgazamiento de la capa protectora de la estratosfera y el famoso “agujero del antartico”⁽¹²³⁾.

Por otro lado, el aire de la troposfera ha sido peligrosamente contaminado debido a las emisiones de monóxido de nitrógeno (NO), dióxido de nitrógeno (NO₂), monóxido de carbono (CO), metano (CH₄), ácido sulfúrico (H₂SO₄) y otros compuestos ácidos por los procesos industriales, el tráfico vehicular, etc., favoreciendo el aumento de las concentraciones de ozono hasta 0.1ppmv o más, las cuales deberían ser 300 veces menor que en la estratósfera.

La mezcla del ozono localizado en la troposfera, mezclado con los compuestos de smog de las grandes ciudades, se ha convertido en el principal agente tóxico de los pulmones, ojos, nariz y en menor medida la piel⁽¹²⁴⁻¹²⁶⁾. Esta problemática ha apoyado el dogma de que el ozono es siempre tóxico y no puede ser utilizado como agente terapéutico, sin embargo recientes hallazgos de que los leucocitos humanos activados pueden producir ozono, son de extrema importancia en situaciones normales y patológicas^(127,128).

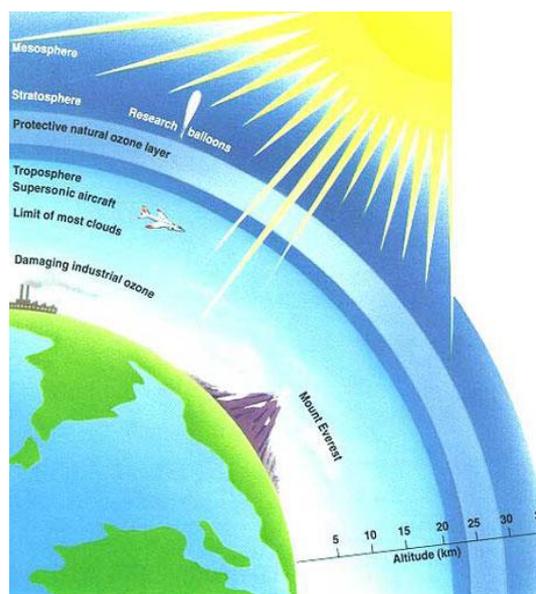


Fig. 2: Localización del ozono ambiental

Tabla V: Efectos tóxicos del ozono	
Concentración de O₃ en aire (ppmv)	Efectos tóxicos
0.1	Lagrimo e irritación de las vías respiratorias superiores.
1.0-2.0	Rinitis, tos, dolor de cabeza, náuseas ocasionales, vómitos. Los sujetos predispuestos pueden desarrollar asma.
2.0-5.0 (10-20 min)	Aumento progresivo de la disnea, espasmo bronquial, dolor retrosternal.
5.0 (60 min)	Edema pulmonar agudo, ocasionalmente parálisis respiratoria.
10.0	Muerte en 4h.
50.0	Muerte en minutos



La gravedad de los signos patológicos por la intoxicación del ozono, están relacionados con la concentración de ozono y el tiempo de exposición. Estos efectos se empeoran si se aspira el ozono mezclado con aire contaminado con compuestos ácidos, ya que la capacidad amortiguante y antioxidante de los fluidos que cubren al tracto respiratorio (RTLFS) es muy débil. El tratamiento para el paciente intoxicado es la aspiración oxígeno humidificado, con una administración endovenosa lenta de ácido ascórbico y glutatión reducido (GSH) disueltos en solución de glucosa al 5%⁽¹²⁹⁾.

2.4.-Producción de ozono para la práctica médica y su dosificación

El ozono, debido a sus propiedades; solo debe producirse cuando sea necesario y utilizarse inmediatamente. El generador de ozono que se utilice debe ser seguro, no tóxico y reproducible; fabricado con materiales resistentes al ozono como el acero inoxidable inox 316L, titanium puro grado 2, vidrio pyrex, teflón, viton y poliuretano y, que se permita medir en tiempo real la concentración del ozono por medio de un fotómetro fiable⁽¹³⁰⁾.

Un generador médico de ozono está compuesto de 2-4 tubos de alto voltaje, conectados en series para un programa electrónico, capaz de establecer voltajes diferentes (4000-13000 volts). En el sistema definido como la “corona de descarga” del ozonador, el ozono es sintetizado cuando el oxígeno pasa a través del espacio entre el alto voltaje y una superficie de electrodos, que crean un campo de energía. La energía de la descarga eléctrica permite romper las moléculas de oxígeno en átomos; y el exceso de éstos forman la molécula triatómica de ozono. El generador debe ser alimentado con oxígeno puro medicinal, y en la boquilla de suministro, se obtiene la mezcla final de gas, compuesta por 5% de ozono y 95% de oxígeno, que puede ser colectado por una presión ligeramente positiva. Para fines médicos, el aire no puede ser utilizado, ya que contiene 78% de nitrógeno y la mezcla final de gas contendría una cantidad variable del altamente tóxico NO⁽¹³⁰⁾.

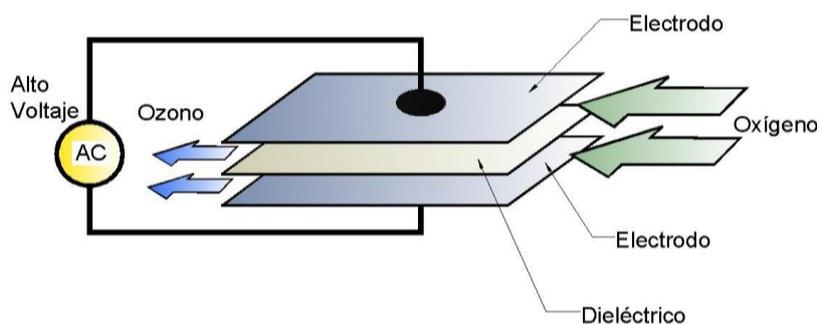


Fig.3: Corona de descarga

El ozono no puede ser liberado en el ambiente; para seguridad de los pacientes y del personal médico, debe contarse con un destructor de ozono y un aspirador que permita un adecuado cambio de aire. También se debe utilizar un monitor analizador

con luces de advertencia y una alarma que indiquen cualquier contaminación. La organización mundial de la salud (WHO) permite trabajar por periodos de 8 horas, cuando la concentración del ozono es de 0.06ppmv (0.12mcg/L).

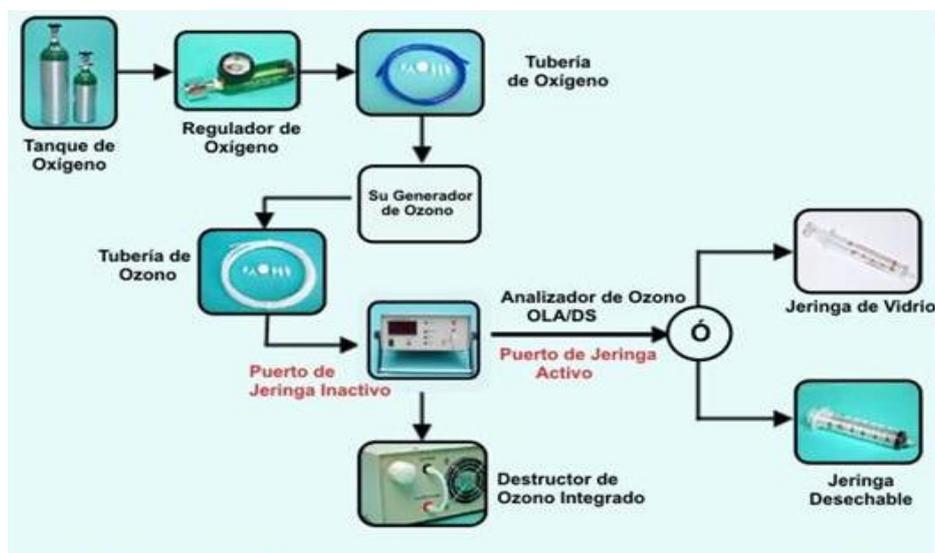


Fig. 4: Diagrama de instalaciones para ozonoterapia

2.4.1. La concentración de ozono

La ozonoterapia se basa en el postulado de que es una droga real; por lo tanto; para que el tratamiento progrese, la dosis debe ser cuantitativamente precisa. Esto hace indispensable someter al generador a periodos de mantenimiento y control por valoración iodométrica del fotómetro⁽¹³⁰⁾.

El generador médico normal distribuye concentraciones de ozono de 1 a 70-100mcg/ml. La concentración está determinada por tres parámetros:

1. *El voltaje:* La concentración final de ozono aumenta con el voltaje, aunque no de manera proporcional.
2. *El espacio entre los electrodos:* esto sirve para modular un aumento gradual de la concentración de ozono.
3. *El flujo de oxígeno:* que esta expresado como un volumen de litros por minuto (L/min) y normalmente puede ser regulado de 1-10L/min. La concentración de ozono es directamente proporcional al flujo de oxígeno; por lo tanto por unidad de tiempo, cuanto mayor sea el flujo de oxígeno, menor será la concentración de ozono y viceversa.

El criterio para calcular la dosis de ozono es el siguiente:

- (A) El volumen total de la mezcla de gas compuesta por ozono y oxígeno.



- (B) La concentración de ozono expresada como mcg/ml.
- (C) La presión barométrica (mmHg), si es diferente de la normal. Por razones de seguridad, se aconseja evitar la presión hiperbárica.

La dosis total de ozono es equivalente al volumen de gas (ml) multiplicada por la concentración de ozono (mcg/ml)

Como un ejemplo; si utilizamos un volumen de 100ml de sangre y el equivalente de gas (1:1); con una concentración de ozono de 40mcg/ml, la dosis total de ozono es: $100 \times 40 = 4000 \text{mcg}$ ó 4.0mg ⁽¹³⁰⁾.

2.5.-Mecanismo de acción del ozono

Cuando se administra ozono a un paciente, se desencadenan diversas reacciones bioquímicas, farmacológicas, inmunológicas y posiblemente psico-neurológicas.

Aunque gracias al oxígeno podemos vivir, este gas desencadena un efecto negativo a largo plazo, ya que la respiración celular permite la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre las cuales el radical hidroxilo (OH[•]), es uno de los compuestos más destructivos de las enzimas y ADN. El ser humano en reposo produce alrededor de 5g de anión superóxido (O₂⁻); el cual es producido en la mitocondria por los complejos I y II y es el precursor de varias moléculas de radicales^(131,132). Otras ROS como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el ácido hipocloroso (HCIO) y el óxido nítrico (NO) son generados continuamente en pequeñas cantidades por las oxidasas y mieloperoxidasas, y tienen un papel esencial en la defensa contra organismos patógenos. Por otro lado, el envejecimiento, los desórdenes metabólicos (diabetes, aterosclerosis, degeneración celular, etc.) pueden empeorar debido a una producción excesiva de las ROS. Irónicamente, la falta parcial de oxígeno (hipoxia), observable en las enfermedades vasculares isquémicas, representa la causa de muerte por infarto cardiaco o choque. Además la hipoxia aumenta la metástasis neoplásica y conlleva finalmente a la muerte⁽¹²⁹⁾.

El ozono se disuelve fácilmente en la parte acuosa del plasma, en los fluidos extracelulares, y en la ligera capa de agua que cubre la piel, la mucosa del tracto respiratorio, intestino, vagina, etc., a una temperatura, presión atmosférica y presión relativa normal. Posteriormente, debido a su alta solubilidad, reacciona inmediatamente con las biomoléculas y iones presentes en los fluidos biológicos: antioxidantes, proteínas, carbohidratos y principalmente ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), presentes también en las membranas celulares y/o lipoproteínas que están protegidas por antioxidantes y albúmina^(133,134).



La reacción del ozono con estas moléculas implica el desarrollo de varios procesos fundamentales que se desencadenan al mismo tiempo. Algunas de las dosis de ozono se consumen durante la oxidación del ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$), ácido úrico ($C_5H_4N_4O_3$), sulfhidrilo (SH^-), grupos GSH (formas reducidas de glutatión), proteínas y glicoproteínas presentes en el agua del plasma. La otra reacción fundamental es la conocida como “peroxidación lipídica”. En el ambiente hidrofílico del plasma, un mol de un ácido graso poliinsaturado (particularmente ácido araquidónico transportado por la albúmina o presente en el plasma, triglicéridos y quilomicrones) y un mol de ozono dan lugar a dos moles de aldehídos y un mol de peróxido de hidrógeno^(129,135).

Estas reacciones completadas dentro de segundos, consumen el total de la dosis de ozono que genera peróxido de hidrógeno y una gran variedad de aldehídos conocidos como productos de la oxidación lipídica (LOPs).

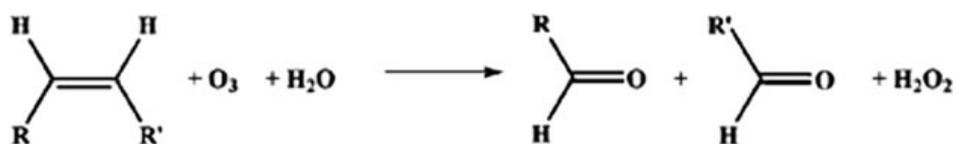
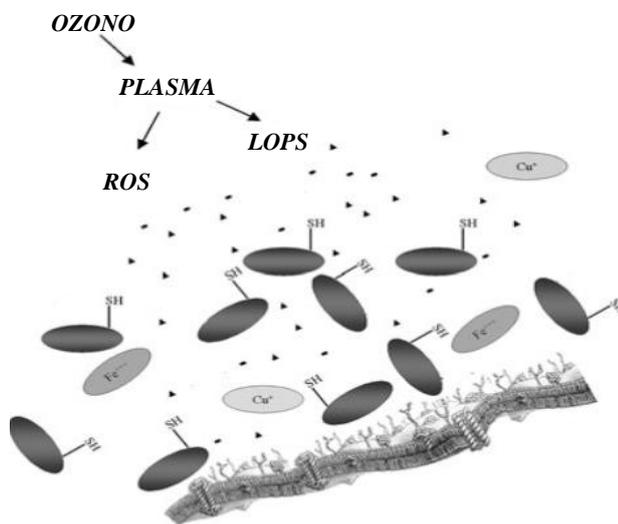


Fig.5: Formación de peróxido de hidrógeno a partir de la administración de ozono

Por lo tanto, debe de quedar claro que algunas de las dosis de ozono son neutralizadas por los antioxidantes presentes en el plasma y solo la reacción con los PUFA's es la responsable de los efectos biológicos y terapéuticos, lo que define que una dosis muy baja de ozono es inefectiva. Por otra parte, después de la ozonización de la sangre, la capacidad antioxidante del plasma disminuye en un 30% después de 5 minutos, pero regresa a valores normales durante los siguientes 15 minutos debido a la rápida reducción de los antioxidantes oxidados operados por los eritrocitos^(136,137). Esta observación enfatiza que incluso con dosis de ozono tan altas como 80mcg/ml gas por ml de sangre, la capacidad antioxidante del plasma puede ofrecer protección a las células sanguíneas⁽¹²⁹⁾.

Las ROS incluyen varios radicales como el anión superóxido (O_2^-), monóxido de nitrógeno (NO), peroxinitrito ($O=NOO^-$), el ya mencionado radical hidroxilo y otros componentes antioxidantes como el peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso (HClO). Todos estos componentes son potencialmente citotóxicos⁽¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾ pero con una vida media muy corta (normalmente una fracción de segundo) y el plasma y las células tienen antioxidantes capaces

Fig.15: Inducción del estrés oxidativo transitorio y controlado por los antioxidantes de la sangre



de neutralizarlos si sus concentraciones no rebasan su capacidad antioxidante. Este concepto enfatiza el por qué la dosis de ozono debe ser precisa y bien calibrada contra la capacidad antioxidante y de ese modo la sangre sea capaz de desencadenar reacciones útiles sin provocar cualquier daño⁽¹²⁹⁾.

Los LOPs generados después de la peroxidación de una gran variedad de PUFA's, son heterogéneos y representan los radicales peroxil (ROO), hidróperóxidos (R-OOH) y un complejo aldehídico mixto llamado malondialdehído (MDA) y alquenos, entre ellos el 4-hidroxi-2,3 transnonenal (4-HNE), que es potencialmente citotóxico. La cantidad de LOPs se puede controlar mediante el uso de concentraciones precisas de ozono, exactamente relacionadas con el volumen sanguíneo y la capacidad antioxidante, para alcanzar una gran cantidad de efectos biológicos no alcanzables con una sola droga⁽¹⁴¹⁾.

Las ROS son producidas durante un corto periodo de tiempo, en el que el ozono está presente y fácilmente producen efectos biológicos en la sangre, mientras que los LOPs, que son simultáneamente producidos, tienen un tiempo de vida más largo y a través del sistema vascular alcanzan prácticamente todos los órganos en donde ellos podrán desencadenar más tarde los efectos⁽¹²⁹⁾.

Tan pronto como el ozono se disuelve en el agua plasmática y reacciona con los PUFA's, las concentraciones de las ROS (principalmente el H_2O_2) comienzan a incrementar, pero con la misma rapidez, disminuyen porque se asocian rápidamente a las difusas moléculas existentes dentro de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, donde se disparan varias vías bioquímicas. Este aumento de las ROS no representa toxicidad para la célula, porque al mismo tiempo el plasma y el líquido intracelular se someten a una reducción de agua gracias a la presencia de poderosas enzimas antioxidantes tales como la catalasa, glutatión peroxidasa (GSH-Px) y glutatión libre reducido (GSH). Quizás durante unos pocos segundos, el gradiente químico de las ROS, entre el plasma y el líquido intracelular ha sido estimado en un rango de 1 a $5\mu M$ equivalente a un 10% de su concentración plasmática, el cual evita cualquier toxicidad⁽¹⁴¹⁻¹⁴⁴⁾. La presencia transitoria de las ROS en el citoplasma, significa que actúan como mensajeros químicos del ozono y que su nivel es crítico: debe estar por encima de cierto umbral para ser eficaz pero no demasiado alto para ser nocivo. En estudios realizados con sangre humana expuesta a concentraciones de ozono que van de 20 a 80mcg/ml por ml de sangre, el proceso de generación de las ROS, difusión y reducción fue siempre encontrada extremadamente transitoria^(136,145-147). Incluso se considera a estas moléculas como un elemento fisiológicamente omnipresente en el cuerpo^(148,149).

Por otra parte, las ROS son reconocidas como moléculas de señalización intracelular, capaz de activar una tirosin-kinasa, la cual fosforila un factor de transcripción nuclear ($NF\kappa\beta$) que permite la síntesis de numerosas proteínas



diferentes^(150,151). Básicamente las funciones de las ROS por oxidación de cisteínas, actúan sobre las células mononucleares de la sangre, en plaquetas, en células endoteliales y en eritrocitos^(146,147,152-157).

Las ROS que entran en los eritrocitos, casi inmediatamente son reducidas a agua e hidroperóxidos a expensas de GSH. La enorme masa de eritrocitos puede limpiar fácilmente las ROS en 10-15 min y reciclar de nuevo antioxidantes oxidados de forma reducida^(158,159). Mientras la glutatión reductasa (GSH-Rd) utiliza la reducción de nicotinamida adenin dinucleotido fosfatasa (NADPH, esta coenzima sirve como un electrón donante para varias reacciones bioquímicas) para reciclar glutatión oxidado (GSSG) a su nivel original de GSH, el NADP oxidado es reducido después de la activación de la vía de la pentosa fosfato, de los cuales la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G-6PD) es la enzima clave. Así la glicólisis es acelerada con un consecuente incremento de niveles de ATP. Por otra parte, la reinfusión de eritrocitos, por un corto periodo, mejora la entrega de oxígeno dentro de los tejidos isquémicos porque de un cambio a la derecha de la curva de disociación de oxígeno-hemoglobina debido a una leve disminución de pH intracelular (efecto de Bohr) y/o un incremento de niveles de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG)⁽¹²⁹⁾.

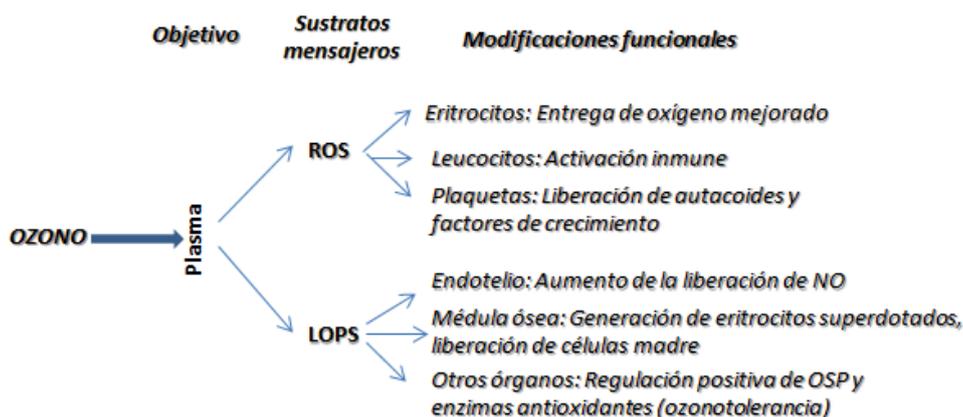


Fig.7: Efectos de los productos del estrés oxidativo inducido por la ozonoterapia

Existe una amplia literatura con respecto a la citotoxicidad de los LOPs⁽¹⁶⁰⁾. Estos compuestos cuando se prueban ya sea en cultivos de tejido, o examinados en el contexto delicado del sistema respiratorio, son tóxicos incluso a una concentración de 1µM. Sorprendentemente, las concentraciones submicromolares (0.01-0.5µm) probados en varios tipos celulares, pueden estimular la proliferación y tener útiles actividades bioquímicas. Estos hallazgos llevan a creer que la toxicidad de los productos lipídicos ozonizados depende de sus concentraciones finales y tejido-localización, de modo que pueden actuar como dañinos o ser útiles señales⁽¹⁶¹⁻¹⁶⁶⁾. La sangre en comparación con los pulmones, es un “tejido” mucho más resistente al ozono, sin embargo, cuando se reinfunde sangre ozonizada a pacientes con degeneración macular (ARMD), los LOPs desaparecen de la sangre en un tiempo aproximado de 4.2 ± 1.7 min. Por otra parte, en muestras de sangre ozonizada cultivada in vitro, los niveles de los LOPs difícilmente



disminuyen durante las siguientes 2h, observando la toxicidad de los mismos en los cultivos celulares estáticos, lo que ha hecho hincapié en el papel de la degradación enzimática y la captación hepática; haciendo irrelevante la toxicidad de LOPs in vivo para los siguientes procesos⁽¹⁶⁷⁾:

1. *Formación de productos de adición de albúmina-4-HNE*⁽¹⁶⁵⁾.
2. *Dilución de compuestos en la sangre y fluidos corporales.*
3. *Neutralización de LOPs.*
4. *Detoxificación de LOPs*^(168,169).
5. *Excreción de LOPs dentro de la orina y bilis*⁽¹⁷⁰⁾.
6. *Bioactividad sin toxicidad.*

Para un punto de vista farmacocinético, los vestigios de las cantidades de LOPs pueden reaccionar con todos los órganos, particularmente con la médula ósea y SNC. Los LOPs son extremadamente importantes informadores de células de un mínimo y calculado estrés oxidativo, provocando una respuesta adaptativa. Con respecto a los eritrocitos, los LOPs pueden influir en el linaje eritroblástico que permite la generación de células con características bioquímicas mejoradas. Esos “eritrocitos mejorados”, debido a una inducción de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, un elevado contenido de 2-3-DPG y enzimas antioxidantes, son capaces de distribuir una mayor cantidad de oxígeno dentro de los tejidos isquémicos. La consecuencia de los tratamientos repetidos, obviamente dependiendo del volumen de sangre ozonizada y la concentración de ozono; es que después de unos pocos minutos de iniciado el tratamiento, aprox. 0.8% “eritrocitos mejorados” entraran diariamente en la circulación y gradualmente sustituirán a los viejos eritrocitos generados antes de la terapia. Esto significa que, durante una ozonoterapia prolongada, la población de eritrocitos incluirá no solo células con diferentes edades, sino que además contendrá eritrocitos con diferentes capacidades funcionales y bioquímicas y un aumento marcado en las enzimas antioxidantes. Este proceso de activación celular es muy dinámico y con duración de un tiempo determinado debido a que las células sanguíneas tienen un tiempo de vida definido y una limitada memoria bioquímica; sin embargo, esta ventaja terapéutica debe ser mantenida con menor frecuencia en los tratamientos^(129,171).

La toxicidad del oxígeno en sangre, fluidos biológicos y órganos internos se evita totalmente al reducir ligeramente la dosis con ozono transitoriamente para activar solamente la multiforme y potente capacidad antioxidante. El sistema antioxidante ha evolucionado durante los últimos dos billones de años como una esencial defensa contra



el oxígeno: esto está compuesto por albúmina, vitamina C y E, ácido úrico, bilirrubina, cisteína, ubiquinol, ácido α -lipoico y de antioxidantes intracelulares como el GSH, tioredoxin y enzimas (superóxido dismutasa (SOD), GPX, GSH-T, catalasa, etc.) y proteínas como transferrina y ceruloplasmina, capaces de quelar el hierro libre y el cobre que, de otra manera, puede favorecer la formación de radicales hidroxilo. La riqueza y variedad de los antioxidantes extra e intracelulares, son capaces de explicar cómo ligeras cantidades de ozono pueden ser dominadas con el resultado de la estimulación de varios sistemas biológicos sin efectos perjudiciales, desechando la teoría de la toxicidad del tratamiento con ozono^(131,172-182).

Tabla VI: Sistema de antioxidantes

No enzimáticos		Enzimáticos	
Hidrosolubles	Liposolubles	Prot. Quelantes	
Ácido úrico	Vitamina E	Transferrina	Super óxido-
Ácido ascórbico	Vitamina A	Ferritina	dismutasa
Glucosa, cisteína	Carotenoides	Ceruloplasmina	Glutatió-
Cisteamina, Taurina	Coenzima Q	Lactoferrina	peroxidasa
Triptofano	Ácido α -lipoico	Hemopresina	Catalasa
Histidina	Bilirrubina	Albúmina	Sistema redox-
Metionina	Tiorredoxina		glutatió
GSH	Bioflavonoides		Equivalentes
Prot. plasmáticas	Melatonina		reductores vía
	Licopeno		NADPH y NADH

La interacción entre antioxidantes, enzimas y el sistema metabólico es muy importante como el permitir su rápida generación y el mantenimiento de un estatus normal de antioxidantes. Durante la exposición de sangre a adecuadas concentraciones de ozono, el reservorio antioxidante disminuye menos de 35% en relación a dosis de ozono entre 10-80mcg/ml de gas por ml de sangre. Es importante añadir que este parcial agotamiento es corregido en menos de 20 min gracias al reciclaje de ácido dehidroascorbico, GSSG, radical α -tocopheril de los componentes reducidos⁽¹²⁹⁾.

2.6.- Vías de administración del ozono

El ozono puede administrarse por cualquier vía parenteral o tópica, exceptuando la vía de inhalación; debido a la toxicidad traqueo-bronquio-pulmonar que se produce.

La mezcla de gas debe estar compuesta de no menos de 95% de oxígeno y menos de 5% de ozono; tiene una leve presión positiva y puede ser colectada con una



jeringa calibrada o por inserción de una conexión de acero inoxidable y un tubo de silicón en la válvula de salida del generador de ozono.

Aunque el ozono es un potente desinfectante, se debe utilizar de preferencia un filtro antibacterial, ozonoresistente, hidrofóbico y con una porosidad de 0.2µm; para evitar una posible infección o el paso de posibles partículas contaminantes, ya que el oxígeno médico, los anillos y grifos no están estériles⁽¹⁸³⁾.



Fig.8: Filtro antibacterial del ozonador

Desde 1984 está prohibida la administración directa de ozono vía intravenosa e intraarterial, debido a que se registraron varias muertes por embolismo pulmonar. Ya que, aunque el gas sea administrado muy lentamente; favorece la formación de un tren de burbujas de gas, de las cuales, las que corresponden a ozono se disuelven y reaccionan con la sangre, pero la parte de oxígeno reacciona en el ventrículo derecho y luego se dirige a circulación pulmonar. La solubilidad del oxígeno a 37°C es aproximadamente 0.23ml por 100ml de plasma, por lo tanto; el plasma venoso no puede disolver eficazmente el oxígeno, llevando a la formación de un émbolo de gas.

Tabla VII: Vías de administración del ozono

<i>Parenteral</i>	<i>Tópica o locorregional</i>
<i>Intravenosa (IV)</i>	<i>Oral* (PO)</i>
<i>Intraarterial (IA)</i>	<i>Tubal</i>
<i>Intramuscular (IM)</i>	<i>Auricular</i>
<i>Subcutánea (SC)</i>	<i>Cutánea</i>
<i>Intraperitoneal (IP)</i>	<i>Vaginal</i>
<i>Intrapleural (IPL)</i>	<i>Uretral e intravesical</i>
<i>Intraarticular (IAr)</i>	<i>Rectal</i>
<i>Intradiscal (ID)</i>	
<i>Intraforaminal (IF)</i>	
<i>Intralesional (ILx)</i>	

*realizarse durante 30-60min en apnea.

Por otro lado no se ha visto ninguna ventaja de la administración “directa” intravenosa o intraarterial, con respecto a la autohemoterapia y la administración rectal; además tendrían que realizarse repetidas punciones en los vasos sanguíneos provocando contracciones vasculares y molestias en el paciente. Sin embargo, la administración de ozono por la arteria hepática, complementada con otros agentes terapéuticos como alcoholes y componentes citotóxicos para el tratamiento de neoplasias y metástasis hepáticas parece ser relativamente útil. Con base en este hecho, es posible entonces



postular que la administración lenta de ozono (20-40ml de gas con una concentración de hasta 80mcg/ml) vía intraarteria hepática dispersa el gas dentro de los sinusoides y capilares tumorales, disminuyendo el riesgo de embolismo gaseoso; y provocando el efecto citotóxico directo en las células tumorales sin los efectos secundarios que conllevan los agentes quimioterapéuticos⁽¹⁸³⁾.

Hace algunos años, algunos curanderos han utilizado la ozonoterapia para el tratamiento de hepatitis viral crónica y vasculopatías administrando peligrosos volúmenes de hasta 300ml de gas a concentraciones de 10-15mcg/ml por vía intramuscular o subcutánea, subdivididos en diferentes regiones del cuerpo, y algunos cosmetólogos han empleado esos mismos volúmenes a concentraciones de 2-4mcg/ml para combatir la lipodistrofia (celulitis), administrándolos en una sola sesión. Esta práctica, aun teniendo el mayor cuidado en la administración de éstos grandes volúmenes, ha provocado la muerte por embolismo en por lo menos dos mujeres jóvenes, quienes se trataron de esta trivial patología en Italia en 1998 y 2002. Esto posiblemente fue provocado cuando el enorme volumen de gas convergió dentro de las partes bajas del cuerpo, después de haberse puesto de pie y caminar inmediatamente después de terminar el tratamiento, a un embolismo pulmonar y/o cerebral particularmente. Este tipo de tragedias puede evitarse administrando un volumen menor de gas, con un gentil masaje posterior al tratamiento y un descanso de por lo menos media hora⁽¹⁸³⁾.

Los médicos rusos han utilizado la vía intraperitoneal e intrapleural. Ellos emplean primero agua ozonizada para realizar lavados, especialmente para barrer el material purulento y luego insuflando dentro de las cavidades 100-300ml de gas con concentraciones de 5-50mcg/ml de ozono; dependiendo de la gravedad de la infección. El ozono se disuelve rápidamente y, por reacciones con los exudados puede reducir la infección. Además mediante la estimulación de la vasodilatación y de la proliferación celular, se puede llegar a una rápida cicatrización. Este tratamiento no es dañino para el peritoneo y no produce ninguna molestia en el paciente y el riesgo de embolismo es prácticamente nulo.

Otras posibilidades interesantes para la aplicación de ozono vía de administración intraperitoneal e intrapleural es⁽¹⁸³⁾:

- a) Pacientes afectados por neoplasias como carcinomas peritoneales o mesoteliomas pleurales, ya que las insuflaciones diarias de gas pueden generar el efecto citotóxico directamente en las células neoplásicas, además de provocar al mismo tiempo la activación de macrófagos y neutrófilos residentes en el área y por vía linfática, la activación de los mensajeros de ozono para la inducción de las citocinas como $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL2 y prostaciclina, que activan al sistema inmune, para acompletar la destrucción de las células neoplásicas^(184,185). Por



otro lado, Stadlbauer ha observado que en ratas precondicionadas con ozono intraperitoneal y que fueron sometidas a un injerto cardiaco agudo, ha prolongado la supervivencia del mismo⁽¹⁸⁶⁾.

- b) Pacientes afectados con hepatitis viral crónica, insuflando el ozono diariamente a través del catéter ya implantado y durante las diálisis peritoneales y complementando el tratamiento con el uso de IFN- α y/o autohemoterapia ozonizada e insuflación rectal del gas.

La aplicación tópica puede ser realizada mediante gas, aceite y/o agua ozonizada.

Afecciones gingivales, en mucosas y tonsilares pueden ser tratadas con catéteres de metal o silicón. Se puede utilizar un volumen de gas de hasta 20ml a una concentración de ozono de hasta 20mcg/ml. Pero el paciente, después de una respiración profunda, debe permanecer en apnea unos 40-60seg y luego expirar profundamente. Las úlceras aftosas en la cavidad oral pueden ser tratadas con mini-inyecciones intralesionales de ozono (a concentraciones de 5-10mcg/ml), seguidas de una aplicación diaria de aceite ozonizado⁽¹⁸³⁾.

Las infecciones vaginales y rectales crónicas (bacterianas, virales, micóticas y protozoarias), resistentes a los tratamientos convencionales, responden muy bien a la ozonoterapia. Se pueden realizar lavados de la cavidad afectada utilizando agua ozonizada para remover las secreciones purulentas y posteriormente insuflar 50-100 y 300ml de gas en la cavidad vaginal y rectal respectivamente y posteriormente aplicar aceite ozonizado. Se debe tener en cuenta que se debe reducir la dosis del ozono conforme la infección disminuya. También se pueden aplicar supositorios y óvulos vaginales de aceite ozonizado antes de acostarse. Estrategias similares también pueden aplicarse para el tratamiento de infecciones uretrales y vesicales, teniendo en mente siempre disminuir las concentraciones de ozono entre 3 y 10-15mcg/ml, respectivamente⁽¹⁸³⁾.

Para realizar las aplicaciones cutáneas de ozono se puede considerar a todos los tipos de lesiones e infecciones; (desde úlceras diabéticas, quemaduras, picaduras de insectos, quemaduras por medusas, traumatismos de guerra, accidentes, etc.). Para utilizar el gas, la lesión debe estar cerrada herméticamente con materiales ozonoresistentes, para prevenir la inhalación del ozono y conseguir una favorable vasodilatación de la zona afectada⁽¹⁸⁷⁾. El generador de ozono, debe estar equipado con una bomba de succión. Si no es factible hacer una exposición dinámica de la zona; se puede improvisar una exposición estática con una bolsa de polietileno grande, sellada con tela adhesiva ancha, pero que no esté apretada para no provocar una éstasis venosa. Ambos sistemas se benefician del empleo de agua, ya que se ha hecho mención



anteriormente, de que el ozono actúa fuertemente en formas húmedas y debe disolverse en agua. Debe tenerse en cuenta, que debe realizarse dos veces al día y antes de cada tratamiento un lavado de la zona, preferentemente con agua ozonizada y la aplicación de aceite ozonizado después del tratamiento y antes de acostarse.

Nadie duda de la potente actividad desinfectante del ozono (probablemente un poco inferior a la del yodo), en lo que respecta a las bacterias gram (+), gram (-), hongos, virus y protozoarios. El barato y simple tratamiento con agua y aceite ozonizados es bien tolerado y es mucho más corto comparado con cualquier tratamiento convencional. La gran ventaja es debida a una serie de factores concomitantes tales como la desinfección, la vasodilatación y la oxigenación con la normalización de la acidosis tisular y la reabsorción del edema⁽¹⁸⁸⁻¹⁹⁰⁾.

La teoría de la secuencia de la cicatrización de las heridas, se ha representado esquemáticamente que ocurre en tres etapas sucesivas⁽¹⁹¹⁾:

- ✓ *Fase I:* indica el estado de la inflamación, normalmente tiene una duración de 2-3 días. La ozonoterapia puede disminuir el riesgo de cronificación en caso de infección secundaria a un traumatismo, diabetes, isquemia local y posiblemente la resistencia a antibióticos.
- ✓ *Fase II:* corresponde a la etapa intermedia, con una duración aproximada de dos semanas. La síntesis de matriz extracelular (fibronectina, colágeno III/I, ácido hialurónico y condroitin-sulfato) está acompañada por una activa proliferación de fibroblastos y queratinocitos. El uso de aceite ozonizado, no solo previene infecciones; también estimula la cicatrización de tejido.
- ✓ *Fase III:* incluye el final de la regeneración definitiva y la remodelación del tejido cicatrizal; puede llevar un largo tiempo en pacientes diabéticos y de edad avanzada. En algunos casos, la liberación excesiva del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1) puede estimular una excesiva fibrogénesis con formación de tejido queloide.

El éxito y la rapidez en la regeneración de una úlcera necrótica en pacientes diabéticos, inmunodeprimidos o con arteriopatías; puede lograrse mediante la combinación del tratamiento parenteral con autohemoterapia ozonizada (AHT) con la aplicación apropiada de aceite y agua ozonizados y controlando estrictamente la glucemia, para que exista una sinergia de los componentes del tratamiento.

Actualmente en el área de ortopedia, el ozono es utilizado particularmente en el caso de dolor de espalda baja aplicando la mezcla del gas por medio de una inyección en los puntos de activación detectables en los músculos paravertebrales de los pacientes.



Esta acción se ha denominado como “acupuntura química”⁽¹⁹²⁾. Se cree que el ozono actúa de forma local en los nociceptores, provocando una respuesta antinociceptiva a través de mediadores químicos. La inyección intradiscal directa del ozono se utiliza con el fin de degradar los proteoglicanos en la hernia de disco.

2.7.-Efectos secundarios y contraindicaciones del ozono

2.7.1. Efectos adversos de la terapia con ozono⁽¹⁸³⁾:

La toxicidad del ozono en el campo de la medicina, se considera igual a la de las ROS, pero existen diferencias substancialmente importantes:

La ozonoterapia es ocasional y puede ser controlada mientras que la formación de las ROS es endógena y sigue imperturbable durante toda la vida^(193,194). Se ha estimado que las mitocondrias de una persona de 70kg producen alrededor de 0.147mol o 5kg/día de superóxido a partir del oxígeno inhalado^(131,195,196); el cual sometido a una dismutación por SODs es la fuente principal de H₂O₂^(138,197), que en presencia de hierro; puede generar el peligroso radical hidroxilo. Mientras una AHT utiliza un máximo de 18mg de ozono; produce menos de 0.4% de la producción diaria mínima de superóxido⁽¹³¹⁾.

La formación de las ROS endógenas en la mitocondria, explica al daño al ADN mitocondrial^(132,198) que se mantiene persistentemente dañado⁽¹⁹⁹⁾; por el contrario, el ozono actúa desde el exterior en el plasma, que tiene un enorme depósito de antioxidantes. No obstante, la dosis de ozono añadida a la sangre, debe alcanzar un nivel de umbral con el fin de generar peróxido de hidrogeno suficiente, del cual solo el 10% pasa del plasma hacia el citoplasma de las células de la sangre, donde se disparan varios efectos biológicos. Para que el ozono actúe, se tiene que inducir un estrés oxidativo agudo transitorio y calculado que se corregirá rápidamente por el sistema antioxidante, así se formarán los radicales peroxilo e hidroxialdehídos, mientras que las trazas de OH y HClO, son rápidamente neutralizadas por una variedad de antioxidantes en el plasma. Es importante tener en cuenta que todos los componentes celulares vitales, tales como enzimas, proteínas, ARN, ADN^(194,200,201) están a salvo durante la descomposición extracelular de ozono.

Otro punto importante de explicar es que algunos autores que han trabajado con cultivos celulares y con eritrocitos lavados con solución de cloruro de sodio, han observado daños citotóxicos y cambios mutagénicos en las células expuestas al ozono por un periodo de tiempo; esto es debido a que con los lavados, las células pierden los antioxidantes. Sin embargo, estos resultados han generado opiniones controvertidas^(202,203). Otros investigadores han reportado y demostrado que el daño celular o genotoxicidad inducida por el peróxido de hidrógeno o sobrecarga de hierro o



de almacenamiento prolongado se puede comprobar si los medios de cultivo de tejidos o plasma contienen cantidades adecuadas de antioxidantes^(164,171,204-211).

Otro error ha sido estar manteniendo varios cultivos celulares en constante exposición al ozono^(212,213) en niveles extremadamente bajos durante varias horas o días dando como resultado la engañosa conclusión de que el ozono es tóxico incluso a niveles mínimos sin tomar en cuenta que el nivel de antioxidantes en los medios de cultivo de tejidos es mucho menor que en el plasma y, en estos estudios no se ha tenido en cuenta la dosis acumulativa de ozono y su propiedad de alta solubilidad; donde el ozono se disuelve en el líquido, reacciona y desaparece, por lo que; más ozono se solubiliza y reacciona, y este proceso se prolonga durante días. Aunque mínima, todas estas reacciones continuas conducen a aumentar concentraciones de H₂O₂, OH, 4HNE, etc., las cuales van a ser inextinguibles a causa de la escasez y el consumo de antioxidantes y por lo tanto llegan a ser tóxicos; demostrando con esto que con el tiempo, incluso la concentración más baja de ozono sin la presencia de antioxidantes, se vuelve tóxica.

Otro efecto adverso observado fue causado por el error de infundir 500ml de solución salina ozonizada IV en 6 pacientes con enfermedad arterial periférica oclusiva (POAD) durante 1h, sin preocuparse por el gran contenido de HClO recién formado; en 3 de ellos se registró un aumento de 450% de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) en el ADN de linfocitos aislados de algunos de estos pacientes desafortunados. El 8-OHdG es un marcador que indica la ocurrencia de la oxidación del ADN. Por lo tanto; esta observación debe impedir absolutamente el uso de la solución salina ozonizada y se sugiere una posible sensibilidad genética a los agentes oxidantes⁽²¹⁴⁻²¹⁶⁾.

En el caso de la utilización del ozono en el área de ortopedia; en donde el gas se administra por medio de una inyección IM, se debe tener en cuenta para el cálculo de la dosis, que si el volumen del gas supera los 10ml, puede desde ocasionar desde dolor muy agudo de la zona de aplicación, una lipotimia transitoria (bradicardia, hipotensión, sudoración profusa, pérdida transitoria de la conciencia, etc.) o hasta un cuadro vagal (efecto inotrópico y cronotrópico negativos), que potencialmente podría llegar a desencadenar un paro cardiaco. Por lo que es aconsejable en el momento de aplicar la “acupuntura química”, administrar la inyección del gas muy lentamente. Con una inyección adecuada, el riesgo de embolismo gaseoso es prácticamente nulo⁽²¹⁷⁾.

La inyección intradiscal directa puede presentar efectos secundarios muy leves y rara cefalea transitoria. Es muy importante colocar al paciente en una posición correcta, según la localización de la lesión, con el fin de evitar la oclusión transitoria de las arterias vertebrales y así evitar lesiones transitorias por isquemia a las fibras nerviosas⁽²¹⁸⁾.



2.7.2. *Contraindicaciones para utilizar la terapia con ozono*⁽²¹⁹⁾:

Antes de iniciar un tratamiento con ozono debe evaluarse la condición clínica del paciente, historial clínico y debe conocerse el tratamiento sistémico que se esté utilizando; además de tener en cuenta las siguientes situaciones que impiden o limitan su utilización.

- a) *Pacientes que presentan favismo*. Enfermedad hemolítica que consiste en un déficit significativo o ausencia de la enzima G-6PD, la cual es fundamental para la reducción de los equivalentes capaces de suprimir la oxidación excesiva y desnaturalización que acorta la vida media de los eritrocitos provocando hemólisis^(215,220-224). Desafortunadamente es primordial el examen de los patrones genéticos de las enzimas antioxidantes o verificar los niveles de TAS en el plasma y determinar si los pacientes tienen una deficiencia de G-6PD. Sin embargo, es importante recordar que la capacidad antioxidante del plasma normal presenta una variabilidad individual de aproximadamente 1.3 hasta 1.8mM que ampliamente protege a las células de la sangre durante la ozonización realizada dentro del rango terapéutico.
- b) *Embarazo*. sobre todo en la primera fase, para excluir todo riesgo mutagénico, (aunque es poco probable).
- c) *Pacientes que han sido tratados con inhibidores de la ECA*. Se ha observado una súbita y marcada hipotensión en la rápida reinfusión de sangre ozonizada en los pacientes tratados con este tipo de fármacos; Que puede deberse a la activación de la cascada de la calicreina-quininogeno^(225,226). Sin embargo; debido a que la bradiquinina se degrada en el plasma en cuestión de minutos se puede sugerir que una infusión muy lenta de la sangre ozonizada puede reducir este efecto, además se puede indicar al paciente omitir tomar el inhibidor de la ECA en el día del tratamiento de la AHT y siempre podemos tener a la mano un fármaco vasopresor.
- d) *Situaciones no controladas de hipertiroidismo, trombocitopenia, hiperglucemia e inestabilidad cardiovascular grave*.
- e) *“Alergia al ozono”*. No utilizar como material para el tratamiento bolsas de plástico que puedan inducir la liberación de alérgenos a partir del material plastificado. No se debe confundir con la hipersensibilidad de los pacientes asmáticos respirando aire contaminado con ozono⁽²²⁷⁾.

Por otro lado en algunos pacientes que han estado deprimidos o asténicos se han observado algunos efectos positivos con la ozonoterapia, han reportado una sensación



de bienestar y euforia después de algún tiempo de tratamiento, pero aún se desconoce si existe un mecanismo de acción para evaluar dichos efectos⁽²²⁸⁾.

2.7.3. Recomendaciones para evitar los efectos adversos en la ozonoterapia⁽²¹⁹⁾:

- a) Realizar una gentil punción venosa (aguja de calibre 19G) para evitar el miedo o nerviosismo del paciente. Se recomienda la administración IV de un volumen de aproximadamente 100ml de solución salina después de recolectar la sangre para la ozonización con el fin de evitar algún caso de lipotimia.
- b) De preferencia se sugiere realizar la infusión muy lenta y siempre la cantidad de sangre debe estar bien calibrada con respecto a la cantidad de citrato de sodio o heparina que se esté utilizando, con el fin de evitar una hipocalcemia transitoria.
- c) Debe evitarse el uso de bolsas de PVC, ya que algunos elementos presentes como aditivos tales como estereato de zinc o Dietilzinc (DEZn) hexanoato pueden provocar algunos síntomas como náuseas, distensión abdominal y sabor metálico en el momento de la reinfusión.
- d) El tratamiento con ozono siempre debe comenzar con una dosis de baja (20mcg/ml) y lentamente ir aumentando hasta 40-50-80mcg/ml según sea necesario para no observar efectos secundarios.
- e) Pueden aparecer algunos casos de “intolerancia definitiva” especialmente en pacientes con historia clínica de atopia o alergia, atribuidos a la sensibilización progresiva debido a la liberación de algún inmunógeno relacionado posiblemente a algunos componentes aditivos al PVC o ftalatos vinculados a las lipoproteínas liberados después de la adición del ozono, por lo que es deseable contar con medicamentos como el succinato sódico de metil prednisolona.

Finalmente; como recomendación se debe mantener un registro médico en el cual se deben registrar todos los eventos patológicos que aparecen en los pacientes durante y después de la ozonoterapia, que conste con una amplia anamnesis e historia clínica del paciente, diagnóstico, tipo de tratamiento ozono-oxígeno, periodo de tratamiento y evolución clínica y siempre que sea posible, el paciente debe ser seguido durante los años posteriores y debe tenerse en cuenta si la enfermedad mejora, o persiste o empeora, así como la posible aparición de nuevas patologías relacionadas con el estrés oxidativo. Debe prestarse gran atención a: agranulocitosis, asma, aterosclerosis, displasia de la médula ósea o atrofia, cataratas, enfermedades degenerativas, enfisema, fibrosis (músculos paravertebrales), enfermedades gastrointestinales, hepatitis, hipertensión, leucemia, y otras neoplasias hematológicas, esclerosis múltiple,



enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, demencias), esclerosis renal, artritis reumatoide, escleroderma, carcinoma de piel, lupus eritematoso sistémico (SLE) y neoplasias.

Un hecho tranquilizador es que después de millones de sesiones de AHT realizadas en Alemania, Austria, suiza e Italia, ni los efectos secundarios de gravedad aguda ni crónica, ni un aumento de la incidencia de cáncer ha sido reportado. Pero no obstante, esto no nos absuelve de tratar de mejorar los controles mediante la monitorización del estrés oxidativo y la peroxidación de los lípidos en los pacientes durante y después de la ozonoterapia; por ejemplo, por mediciones de F2-isoprostanos (F2-IsoPs), hidroperóxidos y/u otros parámetros en el plasma u orina. Por otra parte, nunca debemos bajar la atención sobre el uso de generadores de ozono y las dosis precisas del mismo que son biológicamente activas y atóxicas.

Si la ozonoterapia se realiza correctamente, no tiende a causar problemas, pero el ozonoterapeuta debe ser capaz de superar cualquier emergencia porque un retraso en la intervención puede terminar con la muerte del paciente. Debe saber todos los pasos de la resucitación cardio-pulmonar (RCP) y tener a la mano el ambú, oxígeno médico, un desfibrilador automatizado y algunas pocas ampollas de adrenalina, atropina y corticoides⁽²²⁹⁾.

En conclusión, no se puede evitar decir que el ozono puede ser potencial tóxico y mutagénico como cualquier tipo de fármaco, pero hasta el momento, los datos experimentales y la evidencia clínica no han demostrado ningún riesgo. Por otro lado, un estudio realizado por Jacobs en 1982, donde examino cuidadosamente todos los posibles efectos negativos de la ozonoterapia, a pesar de su famosa “toxicidad”, obtuvo que la incidencia es de solo 0.0007%, una de las más bajas de la medicina⁽²³⁰⁾.



JUSTIFICACION

En la actualidad, el trasplante de órganos y tejidos se ha incorporado como una alternativa más dentro de la terapéutica clínica, revolucionando así el campo de la medicina. El desarrollo de potentes inmunosupresores, antimicrobianos y el refinamiento de las técnicas quirúrgicas, anestésicas y los cuidados postoperatorios ha permitido una mejor selección de los donantes, de los receptores y de un elevado número de investigaciones relacionadas con la preservación de los órganos y las complicaciones del trasplante, lo que ha hecho posible alargar la vida de muchos pacientes en todo el mundo.

En el caso particular del TP, se le considera como la opción terapéutica en el caso de patologías pulmonares no malignas en su proceso terminal (ya sea esta una afección de las vías aéreas, parénquima y/o circulación pulmonar), que tiene como finalidad mejorar la calidad y alargar la vida del paciente.

Desde la década de los 80 se han realizado más de 21000 TP (uni o bipulmonares), con un incremento progresivo de la supervivencia a corto plazo y una mejoría considerable en la calidad de vida de la mayoría de los pacientes, gracias al desarrollo y refinamiento de una técnica quirúrgica y preservación orgánica, optimización del tratamiento y a las mejorías antes mencionadas, que incluyen también la recuperación e inclusión de pacientes inicialmente desestimados; obteniendo además una disminución en las complicaciones postoperatorias. Sin embargo, la supervivencia a largo plazo ha sufrido un estancamiento; ya que la supervivencia actual global ronda en aproximadamente un 53% a los 5 años debido al RC y no ha variado en los últimos 15 años.

Un estudio recientemente realizado por nuestro grupo sobre el RC en el TP experimental con DNA-microarrays, mostró que los procesos de óxido-reducción intracelular y las defensas frente a los mismos están presentes y regulados genéticamente en el RC, deduciendo que si podemos manipular los cambios de la expresión génica a través de la regulación de los factores de transcripción, podemos determinar la respuesta celular frente al daño oxidativo, para desarrollar una nueva alternativa de tratamiento para el control del RC, último responsable del fracaso del órgano y principal causa de fallecimiento a largo plazo de los pacientes sometidos a TP.

Los estudios realizados con O₃ como tratamiento a dosis y por las vías de administración adecuadas, señalan que provoca una activación y potenciación de los sistemas antioxidantes de la sangre y de las funciones biológicas celulares debido a la inducción de un estrés oxidativo **transitorio y controlado**, que no produce efectos perjudiciales y que además su administración repetida induce una respuesta de adaptación al estrés oxidativo que es capaz de reequilibrar el sistema redox alterado por los estímulos patógenos. Además es capaz de estimular las células pluripotenciales de la



médula ósea mejorando las propiedades de estas y de otras células sanguíneas circulantes, como son la inmunomodulación celular y la oxigenación de los tejidos.

El RC continua siendo el talón de Aquiles del TP y la supervivencia a largo plazo sigue siendo baja en comparación a la de otros órganos sólidos, lo que demanda un esfuerzo de la investigación experimental. Valorando la posibilidad de desarrollar una opción terapéutica que ayude a frenar el RC y con el postulado de que el O₃ es un fármaco real y que sus “efectos terapéuticos” podrían contribuir a la disminución del daño ocasionado por la LIR inicial y por el factor crónico de isquemia-inflamación que está ligada al RC del TP se ha desarrollado la presente tesis.



OBJETIVOS

1. “Valorar si el tratamiento con ozono modifica desde el punto de vista histológico el curso evolutivo del rechazo crónico en el pulmón trasplantado”

2. “Valorar si el tratamiento con ozono disminuye el estrés oxidativo relacionado con el rechazo crónico en el trasplante pulmonar mediante cuantificación con PCR en tiempo real”

3. “Valorar el efecto protector del ozono sobre el pulmón trasplantado”



MATERIAL Y METODO

1. Sujetos de estudio.

Para el desarrollo del modelo animal experimental del trasplante pulmonar, se utilizaron 36 ratas macho cosanguíneas (*Rattus norvegicus*), de la cepa Sprague-Dawley (SD), con una edad aproximada de 3-5 meses y un peso vivo que oscilaba entre 300 y 450g^(38,231).



Fig.9: Rata Sprague-Dawley

1.1. Características del alojamiento y manutención.

Dichos ejemplares fueron criados en el bioterio de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Dr. Negrín de Las Palmas de Gran Canaria, obtenidos a partir de una colonia de reproductores (1ª generación) procedente del Centro de Producción Animal de Harlan Interfauna Ibérica SL (Barcelona, España). Los animales fueron destetados a los 21 días de edad, y se mantuvieron en condiciones de estabulación de 4 individuos por jaula (Makrolón III de 20x35x55cm; Allentown Inc., Panlab S.L., Barcelona, España), con un ciclo de luz/obscuridad de 12hrs respectivamente a una intensidad de 270 lux, con una temperatura ambiente de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $50\pm 5\%$, con un sistema de ventilación de 15-20 renovaciones/h. Fueron alimentados *ad libitum* con pellets de una dieta comercial para mantenimiento⁽²³²⁻²³⁴⁾ (R.02-E Standard Diet, Prolabor, España); la cual posee una composición de 15% proteína bruta, 4% grasa bruta, 4% celulosa bruta, 5% cenizas brutas, 12mg/kg CuO, 15000 UI/kg vitamina A, 1500 UI/kg vitamina D3 y 80mg/kg vitamina E. El agua también se ofreció *ad libitum*, siendo purificada por un sistema de ósmosis inversa (Edstrom Industries, Waterford, WI, USA).

1.2. Normativa para el uso, protección y cuidado del animal de laboratorio.

Siguiendo las recomendaciones de la Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA), los animales fueron supervisados en todo momento

para proporcionar bienestar animal, controlar la conducta y el estrés. Fueron valorados los signos fisiológicos oculares (hematoporfirina, hundimiento del globo ocular), respiratorios (frecuencia respiratoria, estornudos, flujo nasal), signos de actividad anormal (anorexia, somnolencia, automutilación, vocalización) y el aspecto externo (piloerección, lordosis, deshidratación, pérdida de peso). la monitorización microbiológica de rutina no reveló presencia de patógenos durante el periodo del estudio experimental^(235,236).

Fueron seguidas las normas nacionales e internacionales vigentes sobre el cuidado, uso y protección de los animales de experimentación, bajo las condiciones sanitarias en la categoría de convencional limpio de acuerdo a las recomendaciones y exigencias recogidas en el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (*National Research Council, 1996*), Directiva del Consejo Europeo 86/609 (Directiva-Comisión de las Comunidades Europeas, 1986), Real Decreto Español 1201/2005 (Ministerio de Presidencia 2005) y la Ley 32/2007 (Cortes Generales, 2007).

2. Instalaciones y equipo.

El desarrollo del modelo experimental fue realizado en el quirófano 1 y en la sala de pre y postoperatorio y laboratorio de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Dr. Negrín. Se utilizó un ventilador Servo-900C[®] (Siemens-Elema, Suecia), un microscopio de pie Zeiss, OPMI[®] 9-12,5x (West Alemania), una nevera Misa[®] de 4 °C, un Congelador Revco[®] de -70 °C y un generador médico de ozono (Ozonosan Alpha plus[®], Dr. Hänsler Nordring, Germany).

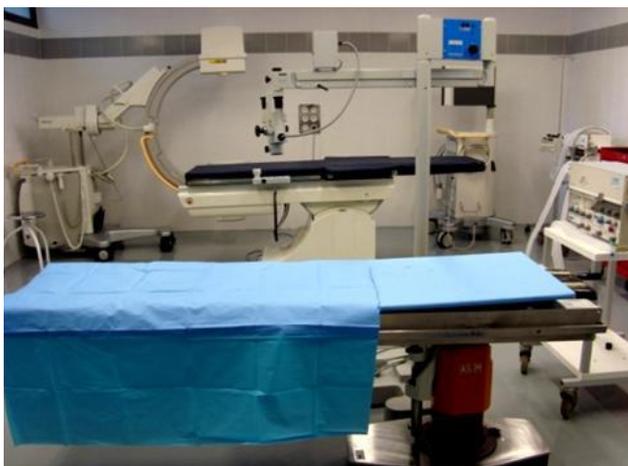


Fig.10: Quirófano 1 de la unidad de investigación del HUGC Dr. Negrín

3. Material quirúrgico y fungible.

Durante el acto quirúrgico se utilizaron paños quirúrgicos estériles, catéteres de venopunción nº 14 y 16 (Abbocath[®], Abbott, Sligo, Irlanda), cuffs (fabricados a partir de catéteres de venopunción cortados en cilindros de 3 mm, con una base de 1,5 mm y una lengüeta de 1,5 mm)^(38,231), sistemas de infusión intravenosa (Intrafix primeline[®], Braun, España), bisturís nº 22, jeringas de 1 y 2ml, agujas 21 y 25G, tijeras de Metzemaum y Mayo, pinzas de Kocher, mosquitos, pinzas de disección, pinzas de Adson, pinzas de microcirugía (relojero), tijeras de microcirugía Westcott, microclamps

vasculares de 3,4mm (Yasargil[®], Medicom Alemania), aplicador de microclamps, portaagujas Baumgartner, blefaróstato Murdock, microportaagujas Castroviejo estriado, microportaagujas Barranquer, suturas de Vycril[®] (Jonhson and Jonhson, Madrid, España) y seda negra 3/0 (Silkan[®]. B. Braun Surgical S.A. España), ligaduras de Prolene[®] de 6/0 y 7/0 (Ethicon, USA), torundas, hisopos y gasas estériles suero fisiológico, líquido de preservación frío Perfadex[®].



Fig.11: Instrumental microquirúrgico



Fig.11: Cuffs
y pinza Yasargil

4. Medicación anestésica y analgésica.

Se utilizó en cada uno de los animales un protocolo de anestesia balanceada fija utilizando como inductor medetomidina (Domtor[®], Pfizer, Madrid, España) y atropina[®] al 1% (Braun, Madrid, España) y como anestésico ketamina (Ketolar 500[®], Pfizer, Madrid, España). El efecto de la medetomidina fue revertido con su antagonista, el atipamezol (Antisedan[®], Pfizer, Madrid, España), como analgésico postoperatorio se empleó buprenorfina (Buprex[®], Schering-Plough, Barcelona, España)^(237,239). Finalmente; para facilitar la intubación orotraqueal, fue utilizado un hisopo empapado con lidocaína al 1% (Xilonibsa[®], Inibsa, Barcelona, España).



Fig.13: Medicación anestésica y analgésica

5. Equipo y reactivos para procesamiento y análisis de las muestras

Para realizar el estudio histopatológico, las muestras de tejido colectadas fueron preservadas en formol al 10% a temperatura ambiente. La deshidratación se realizó mediante un aclaramiento con alcohol y xilol (Leica, TP-1050, Leica Instruments,



GmbH, Nussloch, Alemania), para después ser incluidas en parafina (Leica, Reichert-Jung Histoembedder, Leica Instruments, GmbH, Nussloch, Alemania). Los cortes histológicos se realizaron con un microtomo (Leica, LR-2055 Leica Instruments, GmbH, Nussloch, Alemania). Se utilizó un calentador de agua P Selecta para montar las muestras a portaobjetos de 76x26 Knittel Glaber y posteriormente teñidas con Hematoxilina y Eosina. Para el proceso de tinción se utilizó hematoxilina, alcohol etílico, potasio alume, agua destilada, óxido mercuríco, ácido acético glacial y eosina soluble en agua.

Para purificar el RNA del tejido colectado se utilizó el protocolo de extracción por TRI-reagent (reactivos de Sigma Chemical Co[®], St. Louis, MO) y para la síntesis de cDNA se utilizó el kit Script cDNA síntesis (BioRad[®], Barcelona, España). Los cebadores fueron fabricados por Thermo Electrón (www.thermo.com). Se utilizó SYBR Green (Foster City, CA) para la realización de los RT-PCR.

6. Diseño del estudio

Se diseñó un estudio experimental de TP microquirúrgico con donantes en muerte cerebral, para los cuales se utilizaron 36 ratas macho de la cepa SD y se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos. Ninguno de los animales recibió tratamiento inmunosupresor ni antibiótico postoperatorio, además en este modelo se han incluido algunos aspectos de la técnica quirúrgica que se realiza en pacientes humanos como el control del tiempo de isquemia, perfusión retrógrada en el pulmón del donante y perfusión secuencial controlada del pulmón una vez implantado en el receptor:

1.- Grupo control (n=6). Se les realizó una toracotomía izquierda e inmediatamente se tomaron las muestras de pulmón izquierdo sano.

2.- Grupo sham (n=6). Se les realizó una toracotomía izquierda y se manipuló el pulmón sin lesionarlo y se mantuvo de esa manera durante 50 minutos. A los 3 meses posteriores se tomó una muestra de pulmón izquierdo.

3.- Grupo de TP (n=12; 6 trasplantes: 6 donantes y 6 receptores). Se les realizó un TP unilateral izquierdo con la técnica de cuffs y a los 3 meses se tomaron las muestras de pulmón trasplantado.

4.- Grupo de TP-Ozono (n=12; 6 trasplantes: 6 donantes y 6 receptores). Se les realizó un TP unilateral izquierdo con la técnica de cuffs. Los animales receptores fueron tratados con O₃ por vía rectal diariamente 10 días antes de la cirugía y posteriormente a la cirugía, 3 veces por semana durante 3 meses. Finalizado ese tiempo, se tomaron las muestras de pulmón trasplantado.



Las muestras obtenidas de cada animal se destinaron al estudio histopatológico y al estudio genómico mediante RT-PCR.

7. Técnica quirúrgica.

7.1. Inducción de la muerte cerebral y extracción del pulmón del donante.

El animal donante ha sido sometido a anestesia balanceada general fija, utilizando como inductor el α -2 adrenérgico medetomidina a dosis de 0.5mg/kg subcutánea (SC) (Domtor[®], Pfizer, Madrid, España), combinado con el fármaco anticolinérgico atropina a dosis de 0.04mg/kg intramuscular (IM) (Atropina[®], Braun, España). Después de comprobar el efecto de sedación, se procedió a administrar ketamina a dosis de 75mg/kg intraperitoneal (IP) (Ketolar 500[®], Pfizer, Madrid, España) para obtener el efecto anestésico profundo^(38,237-239).

Una vez anestesiado se rasuró y limpió la parte anterior del tórax y la región craneal y se realizó entubación orotraqueal según la técnica descrita por Weksler y cols⁽²⁴⁰⁾, utilizando un catéter endovenoso de 14G (Abbocath[®], Abott Ireland Ltd., Sligo, Irlanda) y facilitando a la misma con la aplicación de lidocaína 2% (Xylonibsa[®], Inibsa, Barcelona, España) en la epiglotis. Durante todo el proceso de extracción se mantuvo al animal ventilado con una presión inspiratoria de 12 cmH₂O, con una relación inspiratoria/espíroria (I/E) de 1:2, una fracción inspirada de oxígeno (FiO₂) de 0.2, con un volumen corriente (VC) de 1ml/100g de peso y una presión positiva al final de la espiración (PEEP) de 2cm de H₂O y una frecuencia respiratoria (FR) de 60 respiraciones por minuto (rpm)⁽³⁸⁾.

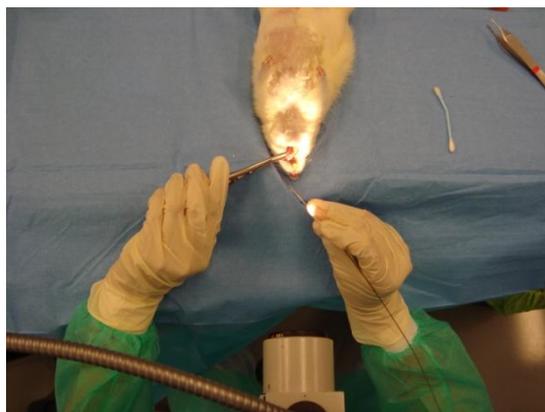


Fig.14: Intubación Orotraqueal

Con la rata en posición decúbito esternal, se realizó con una fresa dental una trepanación de 2mm en la zona antero-lateral a la región de la brema por la cual se introdujo un catéter Fogarty de calibre 3F (LeMaitre[®] vascular, Burlington, MA, USA), posteriormente se llenó lentamente el globo del catéter con 200 μ l de solución salina, con lo que se provocó un aumento gradual de la presión intra-craneana, con el fin de conseguir una hernia cerebral para

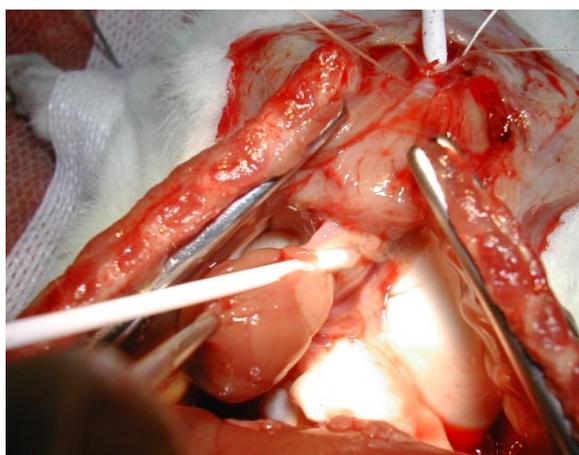


Fig.15: Inducción de Muerte Cerebral

obtener como resultado la muerte cerebral del animal^(38,241,245). El diagnóstico fue comprobado unas horas después por la ausencia de la actividad eléctrica registrada en el encefalograma, presencia de apnea y dilatación pupilar⁽²⁴⁶⁾.

Después se colocó a la rata en decúbito dorsal, se realizó una incisión en la región media del cuello, se retiraron las glándulas salivales sublinguales, submaxilares y parótidas para facilitar la disección de la vena yugular, por donde se administraron 100UI/100g de heparina al 5% (Heparina sódica[®], Chiesi, Barcelona, España). Posteriormente, después de 5-10 minutos se realizó una esternotomía media y con la ayuda de dos pinzas de Kocher se abrió la cavidad torácica, se realizó una timectomía y la disección y clampaje de la arteria aorta torácica ascendente con un microclamp permanente Yasargil de 4mm (Yasargil[®], Medicom, Germany) y al mismo tiempo seccionar la aurícula izquierda, iniciando a partir de ese momento el tiempo de isquemia (periodo de tiempo comprendido desde la interrupción del flujo de sangre con la sujeción de la aorta hasta la reperfusión sanguínea del pulmón después de la anastomosis de la arteria pulmonar)^(38,231).

Luego se realizó el corte de la aurícula derecha, vena cava caudal y cono de la arteria pulmonar para el desangrado del cuerpo del animal. Una vez conseguido, se procedió a la perfusión pulmonar anterógrada con 10-12ml de una solución de preservación fría de glucosa y baja en potasio dextrano (DBP) (Perfadex[®], Kungsbacka, Sweden), la cual fue administrada muy lentamente a través del cono de la arteria pulmonar izquierda utilizando un sistema de infusión intravenosa (Intrafix primeline[®], Braun, España) y un catéter endovenoso del n°16 (Abbocath[®], Abbott, Sligo, Irlanda). Posteriormente se realizó una perfusión retrógrada a través de la aurícula izquierda.



*Fig.16: Esternotomía media y perfusión pulmonar
Cortesía del Dr. N. Santana
y Dr. Ricardo García*

Una vez que se obtuvo una perfusión homogénea, y procurando un estado de semi-insuflación del pulmón se ligó y seccionó la tráquea para la extracción del bloque cardio-pulmonar realizando una tracción ligera, separándolo del esófago y seccionando los troncos supraórticos, aorta, vena cava y ligamento pulmonar. Una vez extraído el

bloque cardiopulmonar, con el microscopio quirúrgico (Zeiss, OPMI® 9-12.5x, West Alemania), se procedió a disecar el hilio pulmonar izquierdo (vena, arteria y bronquio), cortando lo más distal posible al cuerpo del pulmón, pinzando el bronquio antes de cortarlo con un microclamp vascular (Yasargil®, Medicom, Germany), para mantener la semi-insuflación pulmonar⁽³⁸⁾.

Posteriormente se procedió a la colocación de los “cuffs”, sujetándolos con una pinza de la lengüeta, para pasar por la luz del cilindro el tejido del vaso sanguíneo o bronquio, el cual después es evertido y sujetado a la pared externa del cilindro con una ligadura no absorbible de 7/0 y finalmente el pulmón se almacenó en la solución LPDG a una temperatura de 4 °C hasta el momento del implante. En el caso de este estudio experimental, 2h de tiempo después del inicio del tiempo de isquemia^(38,231).

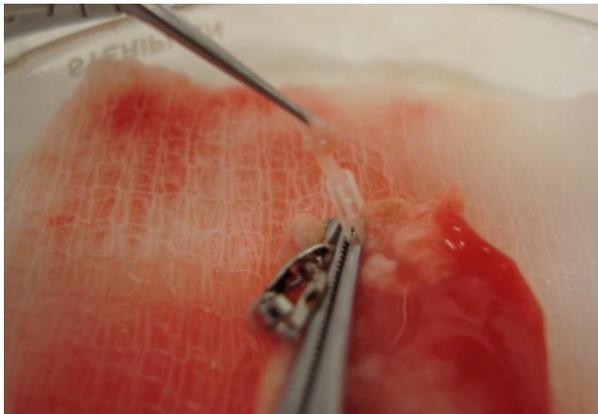


Fig.17: Colocación de cuffs

7.2 Implante del injerto en el receptor.

En esta fase, el animal que fue utilizado como receptor fue sometido al mismo protocolo anestésico y de ventilación que fue utilizado para el animal donante. Una vez conseguido el efecto anestésico profundo y de haber colocado el catéter endovenoso a manera de sonda orotraqueal, se rasuró y limpio el hemitorax izquierdo del animal, se le colocó en decúbito lateral derecho, se realizó una toracotomía lateral izquierda, sobre el 4° espacio intercostal. Se utilizó como separador costal un blefaróstato, para facilitar el abrir la cavidad torácica y poder exponer el pulmón izquierdo, el cual fue traccionado y sujetado con un clip mediano de metal para hojas y poder disecar el hilio pulmonar^(38,231).

Una vez que se disecó el hilio pulmonar y fue posible identificar la vena, la arteria y el bronquio, se colocaron ligaduras y pinzas microvasculares, próximas al corazón, acto seguido se seccionaron parcialmente estas estructuras próximas al pulmón, posteriormente se realizó el lavado de los vasos sanguíneos

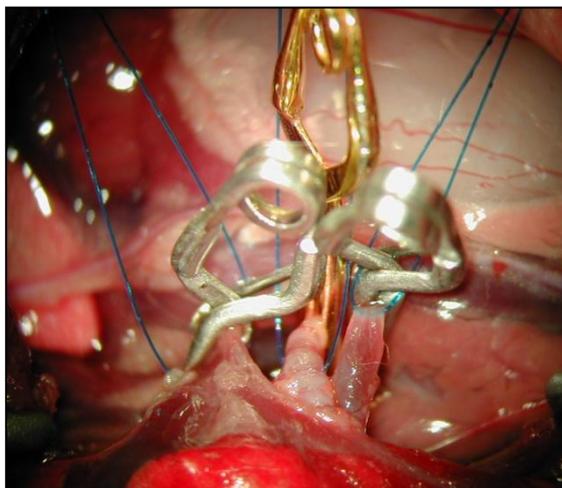


Fig.18: Hilio pulmonar disecado
Cortesía del Dr. N. Santana y Dr. Ricardo García

(intravascularmente) con suero heparinizado^(38,231).

Posteriormente, se realizaron las anastomosis mediante la introducción de los cuffs colocados dentro de la luz en la arteria, vena y bronquio del pulmón del receptor, manteniendo la posición del cuff con una pinza microvascular que se coloca perpendicular a la lengüeta, fijando las anastomosis anudando sobre ellas con las ligaduras no absorbibles de 6/0^(38,231).

Finalmente, se reperfundi6 secuencial y lentamente el pulm6n implantado, abriendo la pinza del bronquio para ventilar el pulm6n y eliminar las atelectasias, continuando con la arteria y por 6ltimo, la pinza de la vena⁽²³¹⁾.



Fig.19: Anastomosis del injerto pulmonar

Una vez que se ventil6 y reperfundi6 el pulm6n implantado, se introdujo gentilmente dentro de la cavidad tor6cica, para luego seccionar el pulm6n nativo y ser retirado por completo. Antes del cierre de la cavidad tor6cica, se retir6 y seco el l6quido libre en la cavidad con la ayuda de torundas de algod6n est6riles, se retir6 el blefar6stato y se coloc6 un drenaje pleural de calibre 8F (Pleurecath[®]), el cual estaba conectado a un recipiente con agua est6ril, con el fin de hacer un mecanismo de sello de agua; se realiz6 el cierre de la toracotom6a por planos; cerrando el plano costal, muscular y subcut6neo con patr6n de sutura de puntos separados en “X” con material absorbible polyglactin 910 de 3/0 (Vicryl[®], Ethicon, Inc, Johnson and Johnson Intl, Bruselas, Belgica) y el plano de piel con patr6n de puntos separados simples con material no absorbible de seda de 3/0 (Silkan[®]. B. Braun Surgical S.A. Espa6a). Una vez que fue cerrada completamente la toracotom6a, se comprob6 que la cavidad tor6cica tuviera de nuevo su presi6n negativa, a continuaci6n se le administr6 al animal atipamezol 0.5mg/kg IM (Antisedan[®], Pfizer, Madrid, Spain) para revertir el plano anest6sico y buprenorfina IM para generar analgesia y, cuando el animal present6 su respiraci6n espont6nea; se retir6 el drenaje, cerrando con un punto en “U” el orificio de salida. Se realiz6 la antisepsia de la herida con la aplicaci6n t6pica de yodopovidona (Betadine[®], Asta Medica, Madrid, Espa6a)^(38,231).



8. Cuidados postquirúrgicos y tratamiento con ozono.

Posterior a la cirugía, los animales fueron llevados al área postoperatoria para proveerles los cuidados y el tratamiento necesario hasta la fecha del sacrificio. En estos cuidados se incluyó: manejo del dolor, evaluación de las constantes respiratorias, estado de hidratación, cuidados generales⁽²⁴⁷⁾. (temperatura, humedad, confort, alimentación, etc.) y el tratamiento con ozono.

8.1. Tratamiento con ozono

Como ya fue mencionado, el acondicionamiento con O₃ a los animales se realizó 10 días antes de la cirugía y posteriormente 3 veces por semana durante 3 meses. Se utilizó un generador médico de ozono (Ozonosan Alpha plus[®], Dr. Hänsler Nordring, Germany), controlando la concentración mixta del gas (O₂-O₃) con un espectrofotómetro UV a 254nm.

Fig.20: Ozonosan Alpha plus[®], Dr. Hänsler Nordring, Germany



El gas se administró por vía rectal en un volumen de 20ml/kg, con una concentración inicial de O₃ de 20mcg/kg, la cual fue incrementando en esos 10 días hasta alcanzar los 50mcg/kg; con el fin de obtener de esa manera la tolerancia a la inducción inicial de estrés oxidativo que se busca con el tratamiento. Posterior a la cirugía del TP, los animales se mantuvieron con la dosis de 50mcg/kg, cada 72 horas hasta el día del sacrificio⁽²⁴⁷⁻²⁵⁰⁾.



Fig.21: Administración rectal de ozono

9. Obtención y procesamiento de las muestras.

9.1. Sacrificio del animal trasplantado.

El sacrificio de los animales trasplantados se realizó a los 3 meses posteriores al implante. Para ello; el animal receptor fue sometido a anestesia general profunda, utilizando el mismo protocolo anestésico para el trasplante. Una vez anestesiado, se



rasuró y limpio la región esternal del animal, se realizó una intubación orotraqueal y se mantuvo ventilado con el mismo protocolo de VC y FR que se utilizó en la etapa de extracción e implante⁽²³⁷⁻²⁴⁰⁾.

Con la rata en decúbito dorsal, se realizó una esternotomía media y se abrió la cavidad torácica con dos pinzas de Kocher, se realizó una timectomía y se ha obtenido por medio de una punción cardíaca una muestra de 1.5ml de sangre. Posteriormente se disecó el bloque cardio-pulmonar de las adherencias causadas por la cirugía de implante y de la misma forma que se describió como fue realizada la obtención del bloque cardio-pulmonar del donante, se utilizó para la obtención de las muestras del pulmón^(38,231).

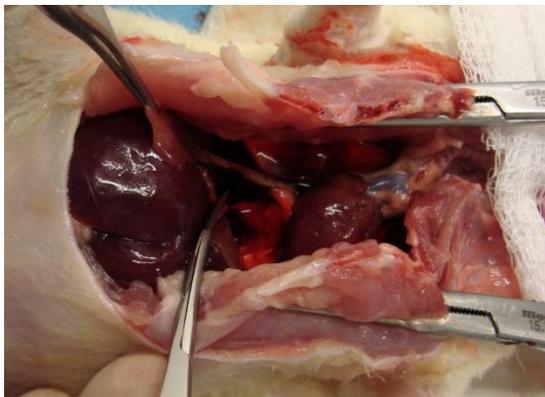


Fig.22: Toracotomía de un animal trasplantado a los 3 meses

10. Mediciones.

10.1. Respuesta clínica al trasplante.

Fue valorada la presencia de signos clínicos como hemoptisis, insuficiencia respiratoria y, si se ha producido el fallecimiento antes del periodo de sacrificio, considerando el momento y posible causa de la muerte.

Fue evaluado radiográficamente la viabilidad del tejido trasplantado, evaluando los signos radiolúcidos que pudieran sugerir un patrón intersticial (no estructurado o miliar) que indicara una posible fibrosis por rechazo a los 15 días, al mes y 3 meses después del trasplante.

10.2. Determinaciones histológicas.

Se colectaron las muestras del tejido pulmonar izquierdo trasplantado y del pulmón derecho correspondiente al pulmón sano, se conservaron en formaldehído al 10%; para su posterior evaluación histopatológica con la técnica convencional de tinción de hematoxilina y eosina. Se evaluó por medio de microscopía electrónica para determinar la presencia de edema pulmonar, congestión vascular, hemorragia alveolar y signos de reacción pleural que se han clasificado el leve, moderado y severo. El grado de rechazo se ha determinado según la clasificación internacional del rechazo pulmonar postrasplante en grado 0 (ausencia de rechazo), grado 1 (muy leve), grado 2 (leve), grado 3 (moderado) y grado 4 (severo), según la presencia de infiltrado mononuclear peribronquial y perivascular.



10.3. Determinaciones genómicas.

10.3.1. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.

Se colectaron las muestras de tejido pulmonar sano y trasplantado, fueron conservadas en congelación hasta el momento de su utilización. Se realizó el protocolo de Tri-Reagent para la extracción del RNA total.

Las muestras congeladas fueron homogeneizadas con Tri-Reagent[®] (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) frío, utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T-10 Basic[®] (Instrumentación científico técnica, España) y se centrifugaron a 12.000g, 10' a 4°C. Después de comprobar la desintegración completa del tejido; se procedió a la fase de extracción.

La extracción se realizó con cloroformo al 100% (sigma-aldrich, USA), posteriormente para eliminar una posible contaminación de proteínas se realizó un lavado con fenol-cloroformo isoamílico (sigma-aldrich, USA) y para evitar una posible contaminación con fenol se realizó el lavado con cloroformo isoamílico (sigma-aldrich, USA).

Finalmente, para la purificación y aislamiento del RNA, se agregó citrato sódico/NaCl e isopropanol para precipitar el RNA, se dejó incubando a -20°C durante 60 minutos, se centrifugó a 12.00g, 4°C por 10 min. Después se realizaron dos lavados con etanol al 75%, se eliminó completamente el sobrenadate y ya seco el pellet de RNA, se disolvió en agua DEPC^(251,252).

Una vez que se obtuvo el RNA, y que se determinó su pureza química por medio del Experion Automated Electrophoresis System[®] (Bio-Rad, España) en un ratio de 28S/18S; se realizó la tinción con bromuro de etidio y electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa (Sigma, St. Louis, Missouri, USA).

Las muestras de RNA fueron tratadas con 2µl de RQ1 DNase (U/µl, Promega[®], Madison, WI) para eliminar la posible contaminación de DNA. Para la síntesis de cDNA, se utilizó el kit Script cDNA síntesis (Bio-Rad[®]). Se mezclaron 2µg de RNA total con 4ul 5x de la mezcla de reacción conteniendo “random primers” y la transcriptasa reversa en un volumen final de 20µl. la mezcla se mantuvo durante 5 minutos a 25°C para permitir el correcto anillamiento de los cebadores y durante 1 hora a 42°C para producirse la extensión. Finalmente las muestras se mantuvieron a 80°C durante 15 minutos con el propósito de inactivar la transcriptasa reversa para que no interfiriera en la PCR.



10.3.2. Determinación de la expresión genómica mediante qRT-PCR.

Se ha determinado la expresión de: *Heat shock 27 kDa protein 1 (Hspb27)*, *Peroxisredoxin 6 (Prdx-6)*, *Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS-1)*, *Glutathione peroxidase 3 (GPX-3)*, *Selenoprotein P, plasma 1 (Sepp-1)*, *Vascular endotelial growth factor A (Vegf-A)*, *Surfactant, pulmonary-associated protein A1 (Sftp-a1)*, *Surfactant associated protein B (Sftp-b)*, *Plasmalemma vesicle associated protein (Plvap)*, *Krüppel-like factor 2 (KLF2)*, *Claudin 5 (Cldn5)*, *Thrombomodulin (Thbd)*, *Delta sleep inducing peptide, immunoreactor (DSIP)*, *Flavin containing monooxygenase 2 (Fmo2)*.

Tabla VIII: Condiciones de la RT-PCR

Gen	Numero	Descripción	Prime Foward	Prime Reverse
<i>Hspb27</i>	NM_031970.3	<i>Heat shock protein 1</i>	GGCACACTCACGGTGG AGGC	GGGAGGGCTGGTGACG GCTA
<i>Prdx-6</i>	NM_053576.2	<i>Peroxisredoxin 6</i>	CCAGCCACCACGGGC AGAAA	CAGCCCAGTTCGCCAG AC
<i>EPAS-1</i>	NM_023090.1	<i>Endothelial PAS domain protein 1</i>	TGCGCCTGGCCATCAG CTTC	CCGTCTTGGGTACCAC GGC
<i>GPX-3</i>	NM_022525.3	<i>Glutathione peroxidase 3</i>	TGGCAAACAGGAGCCA GGCG	AGTTCGCGAGTGGGAGG GCA
<i>Sepp-1</i>	NM_001083911 .1	<i>Selenoprotein P</i>	GCAAGGTCGCTGCAG GAGGG	GCAGGGCTTGGCCCTTG GCT
<i>Vegf-A</i>	NM_031836.2	<i>Vascular endotelial growth factor</i>	CCAGGCTGCACCCACG ACAG	CGCACACCGCATTAGGG GCA
<i>Sftp-a1</i>	NM_017329.1	<i>Pulmonary surfactant-associated protein A</i>	5'CAGAGACGGGAGAG ACGGTGT	5'CAGCTAAGCTGGAAAT CCTGG
<i>Sftp-b</i>	NM_138842.1	<i>Pulmonary surfactant-associated protein B</i>	5'TGCTTCCAACCCCA CACCTC	5'AGAGGACATGGTCTG CTGCA
<i>Plvap</i>	NM_020086.1	<i>Plasmalemma vesicle associated protein</i>	5'ACTACTCGCTGATGC CGGAGT	5'TGGCGTCGCAGCTCTC CATT
<i>KLF2</i>	NM_001007684 .1	<i>Krüppel like factor 2 (lung)</i>		
<i>Cldn5</i>	NM_031701.2	<i>Claudin 5</i>	5'TTCTGTCCACTGCA AGACGGC	5'ATTCCAACGCTGCAG ACCCC
<i>Thbd</i>	NM_031771.2	<i>Thrombomodulin</i>	GGTGCCTGCACCATCG CAGT	GCTGGAGCCAGCACACC CAG
<i>DSIP</i>	NM_031345.1	<i>Delta sleep induced peptide</i>	5'CCCTGGAGCCACTTC CTTCA	5'TCGGTGTTTCATGATTC GGGTT
<i>Fmo2</i>	NM_144737.2	<i>Flavin containing monooxygenase 2</i>	5'AAGCCACCCTCCGT CGATAC	5'TCTGCCATCATCGTCG TCTCC

Se ha utilizado un termociclador de capilares LightCycler 1.5[®] (Roche, Mannheim, Alemania), con el kit "LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I" (Roche, Cat No 12239264001) y el software de lightcyler 3.5.3 y se han seguido las instrucciones del fabricante. Los cebadores que se han utilizado para cada uno de los genes del estudio han sido diseñados utilizando el software online "Primer3"



(<http://frodo.wi.mit.edu/>) y posteriormente se han optimizado con la temperatura de anillado y la concentración de $MgCl_2$. La especificidad de los cebadores fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa, observando que se generó una banda del tamaño esperado. El fragmento amplificado se analizó mediante la curva de *melting* que permite la identificación y diferenciación de las variantes genéticas.

Los cebadores específicos que se emplearon y las condiciones de la qRT-PCR han sido recogidos en la tabla XI. Los resultados fueron corregidos mediante el gen cyclophilin-a (peptidylpropyl isomerase A) como housekeeping gene.

10.4. *Análisis estadístico.*

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS for windows, versión 15.0 (2006, SPSS Inc. Illinois USA). El nivel de significación estadística se estableció para una $\alpha=0.05$. Desde el punto de vista descriptivo, las variables cuantitativas se muestran como media aritmética y desviación típica o como mediana con un máximo y mínimo. Las variables cualitativas se trataron analizando la frecuencia absoluta de la aparición de cada una de las categorías así como las frecuencias relativas. Para comparar las diferencias de medias se utilizó la U de Mann Whitney.



RESULTADOS

1.-Evolución clínica postoperatoria

Todos los animales sham y los trasplantados presentaron una buena evolución postoperatoria. No se observaron dehiscencias ni infecciones de las heridas quirúrgicas en ninguno de los animales.

En la tabla XII, se expresan los tiempos de: la *extracción*; (desde el inicio de la cirugía en el donante hasta el momento de la extracción del bloque cardiopulmonar), de *banco*; (desde la extracción del bloque cardiopulmonar hasta finalizar la colocación de los cuffs), del *implante*; (desde el inicio de la cirugía en el receptor hasta finalizar el cierre de la toracotomía) y de *isquemia del injerto*; (desde el momento del clampaje de la aorta torácica durante la extracción hasta el momento de la reperfusión arterial del injerto en el receptor).

Tabla IX: Tiempos invertidos en la realización de los TP experimentales

Tiempos	Media \pm SD en minutos
Tiempo de extracción	71,5 \pm 19,79
Tiempo de banco	33,13 \pm 6,51
Tiempo de implante	68,91 \pm 6,31
Tiempo de isquemia	237,16 \pm 16,50

2.-Descripción macroscópica de los pulmones

En los animales del grupo control tras la realización de la toracotomía observamos ambos pulmones de aspecto normal con una coloración rojiza brillante, de consistencia suave y superficie lisa con una adecuada expansión y vaciamiento de los mismos, sin dificultad aparente al intercambio gaseoso y sin presencia de focos atelectásicos o fibróticos.

En los animales del grupo sham, no se observaron diferencias macroscópicas significativas con relación al grupo control en el tejido pulmonar; pero si presentaron una mínima cantidad de adherencias entre el pulmón y la pleura parietal a nivel de la toracotomía realizada en esos animales.



En el hemitórax izquierdo de todos los individuos pertenecientes al grupo de trasplante pulmonar sin ozono se observó una desaparición importante de la morfología pulmonar con ausencia de la función ventilatoria a pesar de las maniobras de reclutamiento alveolar. En su lugar se observó un muñón de tejido fibrótico que ocupaba la mitad de la capacidad del hemitórax, de color oscuro, apariencia irregular y rígido, que envolvía los cuffs que se utilizaron para realizar las anastomosis del TP. Dicho tejido presentaba múltiples adherencias a la pared costal y el mediastino ipsilateral. Al corte de la pieza se observó la presencia de cavidades quísticas con un contenido mucoso de coloración amarillo-verdosa. En el hemitoráx derecho observamos un crecimiento compensatorio del pulmón no trasplantado que alcanzaba la cavidad pleural izquierda conservando un aspecto morfológico normal.

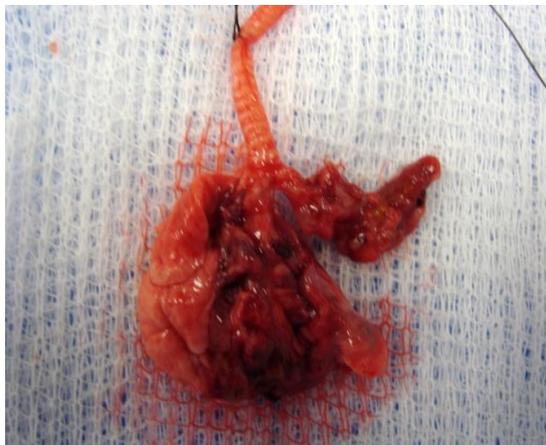


Fig.23: Bloque pulmonar de un individuo del grupo trasplante pulmonar

En el grupo de animales de trasplante pulmonar que recibieron el preacondicionamiento con ozono, se observó en el hemitorax izquierdo una disminución del tamaño del pulmón trasplantado (aunque de menos cuantía) que presentaba una consistencia suave y lisa, con una ligera coloración hialina y algunas zonas atelectásicas, acompañado de un menor número de adherencias a la pared costal y al mediastino. El tejido pulmonar presentaba función ventilatoria aunque inferior a la del pulmón no trasplantado que se incrementó tras las maniobras de reclutamiento alveolar. En el hemitorax derecho seguimos observando el mismo crecimiento compensatorio del pulmón no trasplantado con una morfología aparentemente normal.

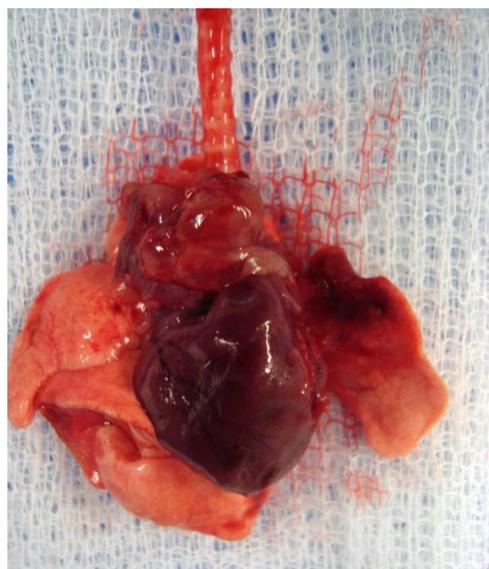


Fig.24: Bloque pulmonar de un individuo del grupo trasplante pulmonar+ozono

3.-Determinaciones histológicas

En el estudio microscópico del grupo control se observó un parénquima pulmonar de aspecto normal en todos los animales (n=6), constituido por tejido conjuntivo fibroso, revestido por células planas con núcleos basófilos que se corresponden con los neumocitos tipo I y otras más aisladas con núcleos grandes y nucléolos que se corresponden con los neumocitos tipo II. Se observaron también



algunos vasos sanguíneos, y en la luz del alveolo (ópticamente vacía) algunos macrófagos.

En el estudio microscópico del grupo sham observamos signos de congestión vascular e hiperinsuflación en 5 animales secundario al proceso de extracción y presencia aislada de histiocitos alveolares en 1 animal, con un aspecto histológico normal, similar del pulmón a la del grupo control en todos ellos (n=6).

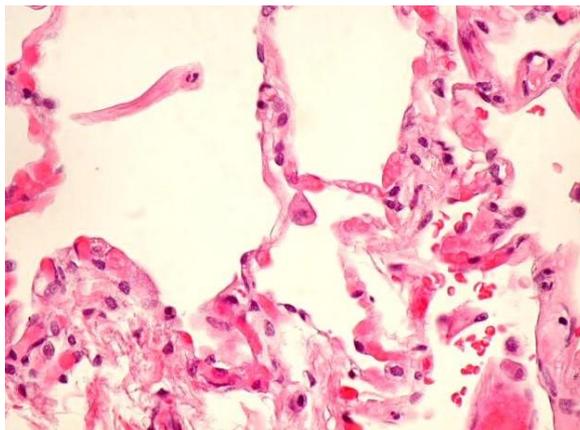


Fig.25: Pulmón histológicamente sano

En el grupo de trasplante pulmonar sin ozono observamos una desaparición del parénquima pulmonar con ligera persistencia de los bronquios y bronquiolos dilatados y rodeados de infiltrados linfoplasmocitarios acompañados de una intensa vasculitis, características de un cuadro de RC severo con importante destrucción pulmonar en todos los animales (n=6)

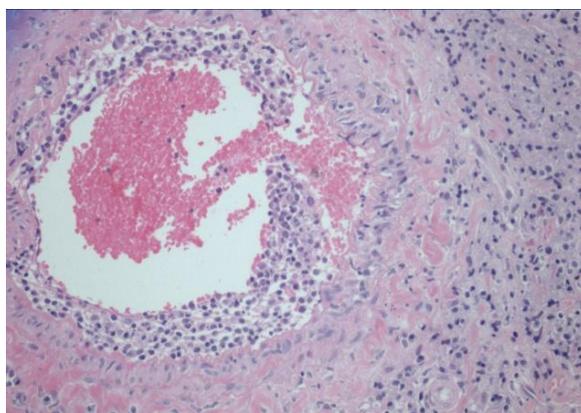


Fig.26: Infiltrados linfoplasmocitarios perivascuales e intensa vasculitis

En el grupo de animales de trasplante pulmonar que recibieron previamente el acondicionamiento con ozono no se observó la presencia de lesiones en 3 animales. Se observó una leve cantidad de infiltrados mononucleares perivascuales e intersticiales, que corresponden a un rechazo agudo leve en 1 animal y signos de bronconeumonía focal sin otras lesiones en 1 animal. En ninguno de ellos se observaron signos de RC. En 1 animal el pulmón no fue valorable por escasas de la muestra.

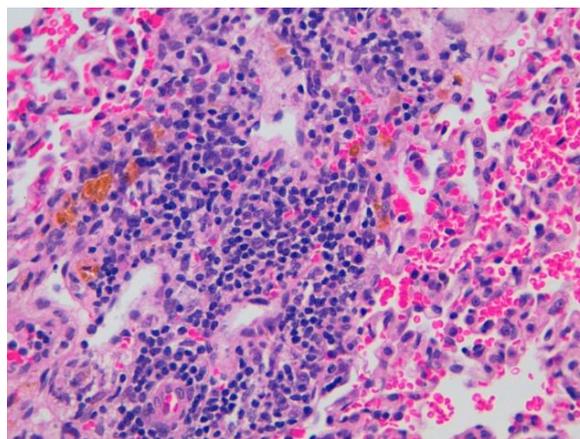


Fig.27 Gpo. de TP-O₃ mostrando un rechazo agudo leve

En la tabla X se muestran los hallazgos microscópicos descritos.

<i>ID Animal</i>	<i>Control</i>	<i>Sham</i>	<i>TP</i>	<i>TP-O₃</i>
<i>Rata 1</i>	Sin lesiones	Congestión, hiperinsuflación	RC severo	Sin lesiones
<i>Rata 2</i>	Sin lesiones	Histiocitos alveolares aislados	RC severo	Sin lesiones
<i>Rata 3</i>	Sin lesiones	Congestión, hiperinsuflación	RC severo	Sin lesiones
<i>Rata 4</i>	Sin lesiones	Congestión, hiperinsuflación	RC severo	RA1 (Rechazo agudo leve)
<i>Rata 5</i>	Sin lesiones	Congestión, hiperinsuflación	RC severo	Bronconeumonía focal
<i>Rata 6</i>	Sin lesiones	Congestión, hiperinsuflación	RC severo	No valorable (Tejido escaso)

4.-Análisis de la expresión genética por RT-PCR

En las tablas XI, XII y XIII se muestran los resultados de los genes analizados por RT-PCR de los pulmones del grupo sham, grupo trasplante y grupo trasplante que fue tratado con ozono, previa normalización de los datos está en función de la cyclophilina. Los datos de las tablas XI Y XII, están estandarizados según la media del grupo sham por lo que se presentan como cambios relativos en relación al mismo, mientras que en la tabla XIII, los cambios relativos del grupo TP-O₃ están estandarizados frente a la media del grupo TP.

<i>Genes</i>	<i>Sham</i>	<i>TP</i>	<i>P</i>
<i>Hspb27</i>	1 ± 0,18	2,60 ± 0,27	<0,001
<i>Prdx-6</i>	1 ± 0,19	1,23 ± 0,57	0,8089
<i>EPAS-1</i>	1 ± 0,15	2,79 ± 0,26	<0,001
<i>GPX-3</i>	1 ± 0,22	0,91 ± 0,29	0,2723
<i>Sepp-1</i>	1 ± 0,15	2,08 ± 0,59	0,0042
<i>Vegf-A</i>	1 ± 0,17	1,60 ± 0,70	0,9605
<i>Sftp-a1</i>	1 ± 0,20	1,59 ± 0,41	0,9948
<i>Sftp-b</i>	1 ± 0,16	2,13 ± 0,43	0,001
<i>Plvap</i>	1 ± 0,19	2,19 ± 0,54	0,0024
<i>KLF2</i>	1 ± 0,18	1,60 ± 0,08	0,999
<i>Cldn5</i>	1 ± 0,20	2,57 ± 0,33	<0,0001
<i>Thbd</i>	1 ± 0,15	1,32 ± 0,28	0,9822
<i>DSIP</i>	1 ± 0,15	1,22 ± 0,09	0,992
<i>Fmo-2</i>	1 ± 0,18	1,82 ± 0,59	0,0168



Tabla XII: expresión génica del pulmón sham vs el pulmón trasplantado y tratado con ozono

Genes	Sham	TP-O ₃	P*
<i>Hspb27</i>	1 ± 0,18	0,76 ± 0,15	0,143
<i>Prdx-6</i>	1 ± 0,19	0,75 ± 0,12	0,071
<i>EPAS-1</i>	1 ± 0,15	0,90 ± 0,21	0,571
<i>GPX-3</i>	1 ± 0,22	0,43 ± 0,14	0,036
<i>Sepp-1</i>	1 ± 0,15	1,83 ± 0,74	0,180
<i>Vegf-A</i>	1 ± 0,17	0,68 ± 0,17	0,036
<i>Sftp-a1</i>	1 ± 0,20	1,08 ± 0,34	0,571
<i>Sftp-b</i>	1 ± 0,16	0,86 ± 0,07	0,025
<i>Plvap</i>	1 ± 0,19	0,80 ± 0,27	0,025
<i>KLF2</i>	1 ± 0,18	0,60 ± 0,18	0,036
<i>Cldn5</i>	1 ± 0,20	0,68 ± 0,29	0,101
<i>Thbd</i>	1 ± 0,15	0,71 ± 0,19	0,036
<i>DSIP</i>	1 ± 0,15	0,87 ± 0,36	0,786
<i>Fmo-2</i>	1 ± 0,18	0,77 ± 0,15	0,143

Tabla XIII: expresión génica del pulmón trasplantado vs el pulmón trasplantado y tratado con ozono

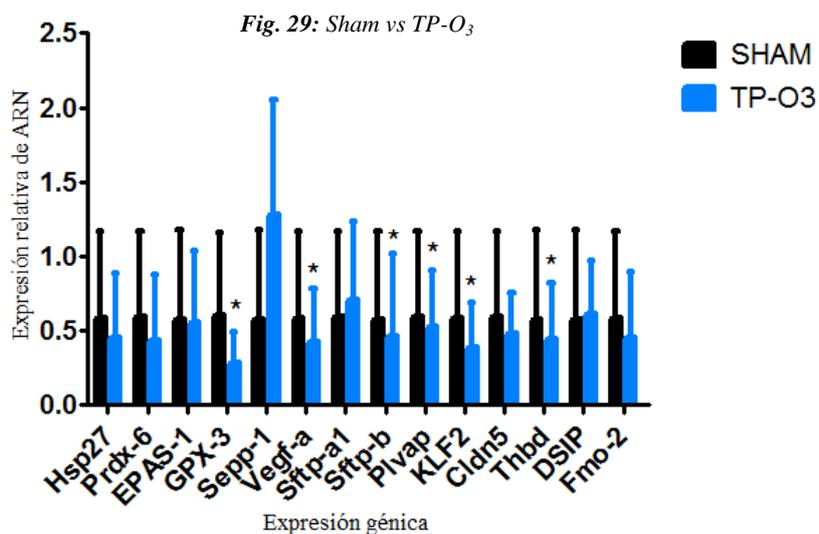
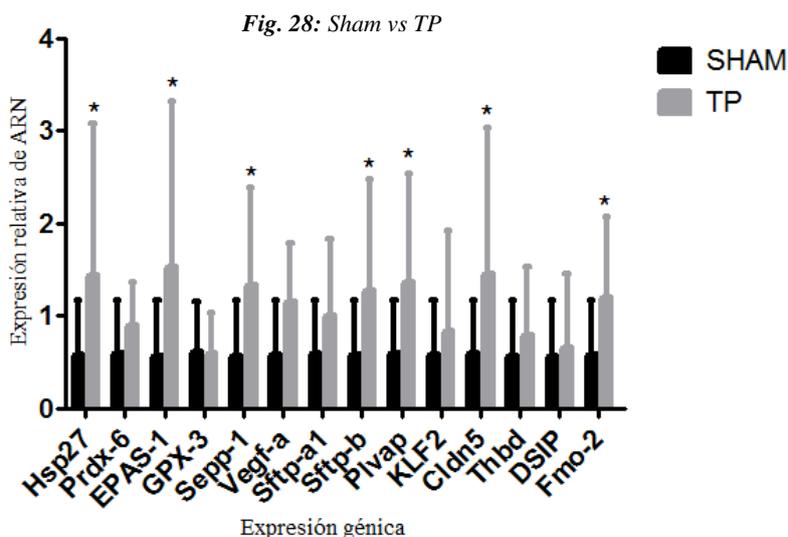
Genes	TP	TP-O ₃	P**
<i>Hspb27</i>	2,60 ± 0,27	0,76 ± 0,15	<0,0001
<i>Prdx-6</i>	1,23 ± 0,57	0,75 ± 0,12	0,0392
<i>EPAS-1</i>	2,79 ± 0,26	0,90 ± 0,21	<0,001
<i>GPX-3</i>	0,91 ± 0,29	0,43 ± 0,14	0,0024
<i>Sepp-1</i>	2,08 ± 0,59	1,83 ± 0,74	0,2612
<i>Vegf-A</i>	1,60 ± 0,70	0,68 ± 0,17	0,0088
<i>Sftp-a1</i>	1,59 ± 0,41	1,08 ± 0,34	0,0191
<i>Sftp-b</i>	2,13 ± 0,43	0,86 ± 0,07	0,0001
<i>Plvap</i>	2,19 ± 0,54	0,80 ± 0,27	0,0002
<i>KLF2</i>	1,60 ± 0,08	0,60 ± 0,18	<0,0001
<i>Cldn5</i>	2,57 ± 0,33	0,68 ± 0,29	<0,0001
<i>Thbd</i>	1,32 ± 0,28	0,71 ± 0,19	0,0015
<i>DSIP</i>	1,22 ± 0,09	0,87 ± 0,36	0,0271
<i>Fmo</i>	1,82 ± 0,59	0,77 ± 0,15	0,0024

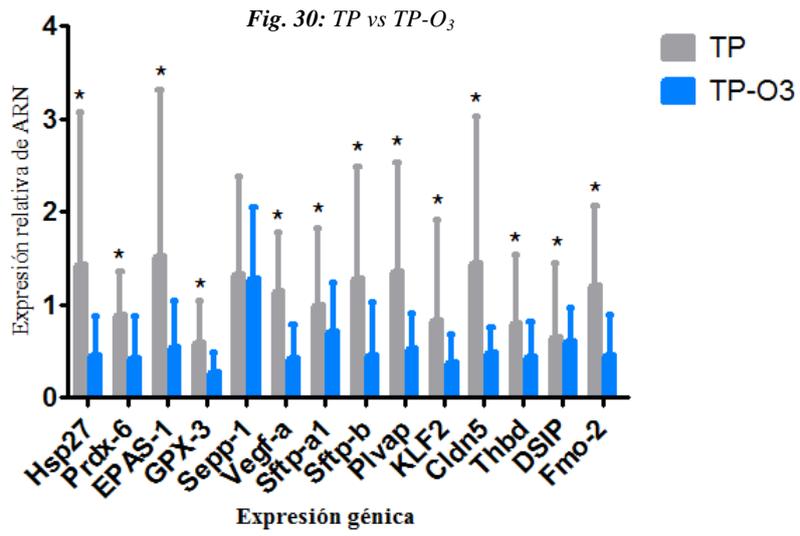
Todos los datos de las tablas XI, XII y XIII fueron expresados en función de la media y su desviación típica. El valor de “p” estima las diferencias entre los grupos mediante el test de la U de Mann-Whitney en donde estadísticamente observamos:



En la tabla XI existe un aumento significativo de la expresión de los genes Hspb27, EPAS-1, Sepp-1, Sftp-b, Plvap, Cldn5 y Fmo-2. En la tabla XII observamos una menor expresión de los niveles de los genes GPX-3, Vegfa, Sftp-b, Plvap, Klf2 y Thbd. Y finalmente en la tabla XIII hay una disminución estadísticamente significativa en la expresión de todos los genes, excepto en Sepp-1.

A continuación se muestra gráficamente la expresión de los genes, indicando cuales presentaron significancia estadística:





DISCUSIÓN

El trasplante de tejidos y órganos; un viejo sueño de la humanidad es uno de los logros más grandes de la medicina que ha llegado a revolucionar la terapéutica clínica y que ha ido evolucionando de manera favorable gracias a una mejor selección de los donantes, receptores y a una ortodoxa técnica anestésica y quirúrgica acompañada de una especialización en los cuidados postquirúrgicos y farmacológicos, principalmente en el campo de los inmunosupresores y antimicrobianos.

El TP representa la última alternativa terapéutica aplicable en el estado terminal de la patología pulmonar no maligna, que incluye afecciones de la vía aérea del parénquima y circulación pulmonar una vez que se han agotado los recursos médicos convencionales. El éxito del paciente que se somete a una intervención de trasplante pulmonar depende de muchos factores tales como el número escaso de donantes, las infecciones y las complicaciones inmunológicas del mismo. Ésta última causa determina el fallo primario del injerto, que se traduce en RA o RC y están relacionados con diferentes lesiones en el pulmón producidas antes, durante y después del trasplante originadas por la isquemia y reperfusión del injerto y por los daños mediados por el sistema inmune.

A pesar de los estudios sobre la mejoría en la supervivencia inmediata para los receptores de un TP, la supervivencia a largo plazo sigue siendo baja en comparación con la de otros órganos sólidos debido a la alta presencia de RC, por lo que sigue considerándose actualmente el talón de Aquiles de este procedimiento terapéutico. El RC se considera como manifestación principal de las complicaciones del TP y que se caracteriza por un proceso linfoproliferativo que conduce a la obliteración de la vía aérea y la fibrosis del injerto y que es la responsable de ésta limitada supervivencia.

Histológicamente, el RC sugiere que es causado probablemente por dos procesos distintos; una inflamación importante de las estructuras bronquiales y un origen inmune y/o infeccioso. Estos inducen una respuesta fibroproliferativa con dilatación de los bronquios y bronquiolos primarios de la vía aérea y una obstrucción progresiva, fibrosis del injerto y desaparición del parénquima pulmonar. La lesión del RC se considera activa si se acompaña de infiltrados en manguito de células linfoplasmocitarias peribronquiales y perivasculares con una intensa vasculitis que indican que nos encontramos ante un rechazo crónico pulmonar severo y se considera inactivo si la infiltración es escasa o ausente.

El objetivo fundamental de este trabajo ha sido valorar si la terapia con ozono influye en la disminución del estrés oxidativo relacionado con el RC del TP y si este tratamiento modifica la expresión génica asociado al mismo. En este sentido, hemos observado que los pulmones de los animales del grupo TP muestran evidentes signos de RC en comparación con los animales del grupo de TP que han sido tratados con ozono en los cuales hemos observado macroscópicamente que existe una preservación de la



morfología pulmonar y que histológicamente no existen lesiones de RC. Lo cual nos indica que el O₃ tiene un efecto protector importante del pulmón trasplantado frente al RC, evitando la aparición de este o al menos retrasando su aparición. Este es un hecho realmente singular, dado que no se ha objetivado un tratamiento farmacológico inmunosupresor capaz de conseguir resultados semejantes a los observados en nuestro estudio con el O₃, con la particularidad de que el O₃ carece de los importantes efectos secundarios de los inmunosupresores y que además estimula las defensas antioxidantes tan importantes en la lucha contra los gérmenes oportunistas, unas de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad de los pacientes trasplantados. De hecho, sólo encontramos signos de infección localizada en forma de bronconeumonía focal en uno de los animales del grupo de TP-O₃.

Por otro lado, las condiciones de hipoxia y el tiempo de isquemia en el TP produce un sufrimiento celular severo, que induce un estrés oxidativo por generación de las ROS^(253,254); entre las cuales encontramos al H₂O₂ y que en un estudio anterior de nuestro grupo realizado sobre el RC con DNA microarrays en un modelo experimental de trasplante pulmonar ortotópico, se observó que existía un importante nivel de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y que éste está relacionado con la respuesta del RC⁽²⁵⁵⁾. Los hallazgos morfológicos observados en los pulmones trasplantados y tratados con O₃ indican que su poder antioxidante y antimicrobiano protege al pulmón trasplantado de los factores etiológicos desencadenantes del RC. Este es el primer estudio en el que se valora el efecto del O₃ sobre el TP, el hecho de que si su efecto de protección es duradero o requiere de la administración prolongada de O₃ tras el TP o si su efecto sólo retrasa la aparición del RC, requiere de nuevos estudios a largo plazo que nuestro grupo de investigación está preparando.

La GPX3 es una enzima antioxidante que se le localiza en el plasma, el sustrato principal sobre el cual actúa es el H₂O₂, catalizando este elemento en productos inofensivos y agua^(254,256) protegiendo de ésta manera a la célula de los efectos degradantes de los hidroperóxidos disminuyendo así el estrés oxidativo^(257,258). La ozonoterapia estimula al sistema antioxidante produciendo y manteniendo constantes los niveles de H₂O₂ en la sangre, entonces el que nosotros hayamos encontrado ésta enzima disminuida en su expresión en el tejido pulmonar de nuestro estudio no quiere decir una ausencia de la actividad antioxidante; sino a que esta acción se está llevando a cabo a nivel plasmático, y probablemente de ésta manera el injerto pulmonar se encuentre protegido, ya que no entra en contacto directo con el H₂O₂.

En nuestro estudio, también observamos cambios interesantes en el comportamiento de la expresión de Vegf-A. Se sabe que este gen está implicado en el aumento de la permeabilidad vascular así como en la inducción de la angiogénesis a partir de los vasos sanguíneos ya existentes como respuesta a estímulos fisiológicos y también a algunos estados patológicos como por ejemplo el desarrollo de tumores o el



trasplante de órganos^(259,260). Por otra parte, también actúa como una citoquina pro-inflamatoria e induce la expresión de una serie de moléculas implicadas en la regulación de la angiogénesis como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), moléculas de adhesión como la selectina, VCAM-1 y factores pro-coagulantes como el factor tisular^(261,262). Estos efectos están mediados por tres tirosin-quinazas estructuralmente relacionadas denominadas VEGFR1/Flt1, VEGFR2/KDR/Flk1, VEGFR3/Flt4^(261,263). La importancia entre el eje VEGFR2-VegfA está relacionada por el hecho de que el ligando y el receptor aumentan los niveles en estados patológicos⁽²⁶⁴⁾, exacerbando las lesiones y el deterioro de la función pulmonar estimulado por la hipoxia^(265,266) ya que contribuye a la formación de edema después de la isquemia-reperfusión^(267,288).

Las funciones de Vegf-A van relacionadas al comportamiento de KLF2. La familia de los factores de transcripción KLF; es una subclase de la familia de los finger-zinc, implicados en la regulación del crecimiento y diferenciación celular⁽²⁶⁴⁾. Se conocen varios subtipos, entre los cuales se ha identificado al KLF2 que se expresa intensamente en las células endoteliales y es requerido para la formación de vasos, como regulador de la pro-inflamación endotelial y de la función pro-trombotica^(269,270). El KLF2 inhibe de forma potente el Vegf-A retardando su expresión por medio de la inhibición de la estimulación inflamatoria activada por NF- κ B y del flujo de calcio mediado por VEGF, controlando de forma potente la inflamación, la angiogénesis y el edema tisular, ya que una sobreexposición a la acción de KLF2 atenúa las citoquinas proinflamatorias inducidas por VEGFR2 inhibiendo de ésta manera la angiogénesis producida por Vegf-A. Esta inhibición de VEGFR2 tiene lugar a través de la competencia por la unión entre el KLF2 y un activador de la transcripción del promotor de VEGFR2.SP1^(261,271). KLF2 también es capaz de atenuar de manera importante la activación de las células endoteliales y la expresión de los genes proinflamatorios mediados por las citoquinas pro-inflamatorias como VCAM-1, COX-2 y el factor tisular⁽²⁶¹⁾. Por lo expuesto consideramos que la presencia y el comportamiento de la expresión de Vegf-A y KLF2 observada en nuestro estudio, probablemente están relacionadas al control de la angiogénesis generada por el proceso de hipoxia, el edema, inflamación y otros signos importantes de manifestación de RC en los animales que recibieron ozonoterapia

Se sabe que en diferentes patologías pulmonares y vasculares en las que su etiología están involucrados procesos de inflamación, isquemia-reperfusión y estrés oxidativo (como por ejemplo bypass vascular y trasplante de órganos) se ve alterada la actividad de la Thbd, una glicoproteína integral de membrana que se expresa en la superficie de las células endoteliales y es abundante en órganos altamente vasculares como el pulmón. Es un cofactor para la activación de la trombina, ya que al unirse; la trombina pasa de un procoagulante a un anticoagulante. Este complejo se une a la proteína C que, en presencia de la proteína S, calcio, y la membrana fosfolípidos, degrada los factores Va y VIIIa, evitando aún más la formación de trombina, y además



de ser incapaz de actuar sobre el fibrinógeno, el factor V o el factor de agregación plaquetaria; jugando un papel importante en el mantenimiento del estado normal anticoagulante del endotelio. La trombina cuando está interactuando con la Thbd posee efectos antiinflamatorios; ya que tiene la capacidad de suprimir los productos inflamatorios tales como endotoxinas, TNF- α , IL-1, la expresión de NF- κ B e interfiere con la activación del complemento y tiene también propiedades profibrogenéticas y es mitogénica; ya que regula citoquinas, moléculas de adhesión, factor de tejido, y los inhibidores de la fibrinólisis⁽²⁷²⁻²⁷⁴⁾. Cuando disminuye la expresión de la Thbd como hemos corroborado en nuestro estudio, tenemos que como consecuencia las concentraciones de trombina son elevadas, se activan los receptores de proteasas de las células; aumentando las respuestas pro-coagulante e inflamatoria. Las células endoteliales dañadas por los radicales libres y la hipoxia, activan los neutrófilos y monocitos, se produce el factor tisular y se inicia la coagulación intravascular diseminada como precursor al inicio del RC. En nuestro estudio observamos que en los animales tratados con ozono esta glicoproteína se encuentra disminuida de manera significativa, probablemente este fármaco no tenga acción sobre la regulación de Thbd^(272,274).

La familia de las proteínas transmembrana Claudín (Cldn), se compone de aproximadamente 23 miembros, que son esenciales para la composición de las estructuras que forman las uniones entre las células endoteliales y epiteliales (tight junction ó TJ)^(255,275), que son las encargadas de la homeostasis de solutos, del control del transporte de membrana y del mantenimiento de la polaridad celular, importantes en la vía aérea además para la composición de las defensas pulmonares. A lo largo de todo el árbol bronquial, aparentemente no se han visto diferencias morfológicas en las TJ, sin embargo, quizás si puedan existir diferencias entre sus funciones electrofisiológicas como consecuencia a la expresión de los diferentes miembros de la familia de los Claudin. Existen algunos estudios que sugieren que las TJ desarrollan cambios importantes de función como resultado de la respuesta a la inflamación asociada a enfermedades crónicas como por ejemplo en la fibrosis quística^(275,276). En nuestro estudio, hemos analizado el comportamiento de la expresión de la proteína Cldn5, ya que en el estudio antes mencionado de DNA microarrays realizado por nuestro grupo de investigación, este es uno de los genes que demostró tener un papel importante en el control de la presentación del RC⁽²⁵⁵⁾. Hemos comprobado una vez más que en los animales que se les ha realizado TP, la expresión de Cldn5 está aumentada, y que en los animales que han recibido tratamiento con O₃, la expresión disminuye de manera importante probablemente porque el ozono está protegiendo la homeostasis celular, evitando los cambios que se generan después del TP.

Hsp27 es una pequeña proteína capaz de formar largas cadenas que actúan como chaperonas involucradas en el plegado y re-naturalización de proteínas y en la degradación de aquellas que se han desnaturalizado de manera irreversible. Desempeña



un papel esencial en la diferenciación de los tejidos y en termotolerancia y citoprotección bajo condiciones de estrés y oxidación. También inhibe la apoptosis y protege a los filamentos de actina de la fragmentación. Posee capacidad para modular las ROS y estimula la expresión de GPX actuando entonces como un citoprotector. Se le ha asociado con la formación de vasos sanguíneos sanos en pacientes con rechazo que han sido sometidos a trasplante cardiaco^(255,277). Estudios recientes han asociado Hsp27 con el desarrollo de BOS por la presencia de niveles séricos elevados de Hsp27 y los niveles de anticuerpos anti-Hsp27 en el BAL de los receptores con BOS^(255,278). Sin embargo, en el estudio que hemos realizado con DNA microarrays, se concluyó que esta molécula protege el citoesqueleto del RC e inhibe la apoptosis⁽²⁵⁵⁾. En el presente trabajo, justificamos nuevamente esta hipótesis, ya que en los animales tratados con O₃ la expresión de Hsp27 esta disminuida, como efecto constante del efecto antioxidante de la terapia y de la protección celular que induce, de forma que al no haber RC no es necesaria la sobreexpresión de estas proteínas con efecto reparador.

Otro gen importante que también está implicada en la regulación de los genes endoteliales, entre los cuales se menciona la actividad de Vegf y que hemos evaluado en nuestro estudio previo de DNA microarrays concluyendo que su expresión en el RC de TP se ve aumentada como consecuencia de la hipoxia, es al factor de transcripción EPAS-1⁽²⁵⁵⁾. Éste se expresa de manera abundante en las células del endotelio vascular y pertenece a la familia de los bHJH-PAS, quienes tienen propiedades de actuar sobre la detoxificación de xenobióticos, el control del ciclo circadiano, la especificación y maduración del tejido, y la remodelación vascular durante el desarrollo embrionario. Es similar en un 48% de sus aminoácidos al factor inducible por hipoxia a1 (HIFa1) que es responsable de la inducción de la expresión del gen eritropoyetina en condiciones de hipoxia y que juega un papel importante en el proceso de homeóstasis de las catecolaminas^(279,280). La disminución significativa de su expresión en los animales tratados con O₃ indican que el ozono también interfiere positivamente con la regulación de EPAS-1, probablemente debido también al efecto protector del O₃ sobre el pulmón, de forma similar a los que ocurre con Hsp27.

Un hallazgo interesante que no se conocía hasta ahora es la presencia de actividad de Plvap en el pulmón, su expresión se encontró aumentada en los animales que fueron trasplantados y que presentaron RC severo. El Plvap es un gen que inicialmente fue identificado como una proteína de superficie celular en el endotelio cerebral inmaduro de roedores⁽²⁸¹⁾. Posteriormente se identificó su presencia en los canales transendoteliales, en los canales caveolae y en el endotelio fenestrado^(282,283). Se sabe que su expresión es reprimida en el SNC normal en relación con la barrera hematoencefálica intacta⁽²⁸²⁾. Se ha identificado como un marcador de la microangiogénesis en neoplasias malignas del cerebro, en una probable relación con la actividad de Vegf⁽²⁸¹⁾. Probablemente la presencia de este gen en el RC del TP también sea inducida por la hipoxia sin que podamos descartar por ahora su papel como mediador del RC vascular



En los neumocitos tipo II, se ha detectado la presencia de Sftp-a1. Es un gen que codifica la síntesis de la proteína surfactante A1 (SP-A1) que es responsable de la inducción de citoquinas pro-inflamatorias de la proliferación de las células inmunes, de la quimiotaxis, del control de la fagocitosis de los macrófagos alveolares, del control de la inmunidad contra antígenos y la modulación de las ROS⁽²⁸⁴⁾. En esta misma familia tenemos al gen Sftp-b, que codifica para la expresión de la proteína surfactante B (SP-B) cuya función es contribuir a la función del líquido surfactante⁽²⁸⁵⁾. El déficit de ambas proteínas se relaciona con la insuficiencia respiratoria, y particularmente la SP-A1 se ha asociado con el síndrome de dificultad respiratoria infantil de los bebés prematuros y con la inmadurez estructural de los pulmones⁽²⁸⁴⁾. Otro dato importante es que a algunas variaciones genéticas de ésta molécula, se les ha relacionado con la fibrosis pulmonar idiopática y con la inflamación de lesiones pulmonares graves, el asma, la fibrosis quística y el envejecimiento⁽²⁸⁶⁻²⁸⁸⁾. En nuestro estudio hemos observado que existe un aumento de la expresión de estos dos genes en el RC, quizás como mecanismo compensador debido a las alteraciones inmunológicas e inflamatorias asociadas al TP e incluso para participar en el control de infecciones bacterianas, de forma que el O3 disminuye la expresión de las mismas hasta valores normales probablemente porque se requiere menos de su expresión al no haber lesiones de RC en estos animales.

La Prdx-6 es una enzima bifuncional miembro de la familia tiol-proteína antioxidante específica, implicada en la regulación redox de la célula, capaz de reducir los ácidos orgánicos de cadena corta, los ácidos grasos, los hidroperóxidos de fosfolípidos y también al H₂O₂, por lo que su papel también es importante en la protección contra el daño oxidativo⁽²⁸⁹⁾. En nuestro estudio, la expresión de ésta molécula tiene el mismo comportamiento que la de GPX3.

La función de la familia FMO es la de metabolizar una amplia gama de fármacos, xenobióticos y algunos sustratos endógenos⁽²⁹⁰⁾. En los humanos, aparentemente existen diferencias entre los alelos que codifican para la expresión de las FMO2 asociado con el origen étnico⁽²⁹¹⁾. Quizás es posible que esta enzima actúe como detoxificante de los productos tóxicos del estrés oxidativo, ya que hemos visto que su expresión aumenta en el RC y disminuye con el tratamiento de ozono; sin embargo habrá que realizar más estudios sobre su funcionamiento y verificar si existe algún cambio en su comportamiento basado en las diferencias moleculares entre especies y/o razas.

En nuestro estudio, también detectamos la actividad de un neuropéptido que no se ha relacionado hasta ahora con el tejido pulmonar, se trata de DSIP. Su función principal es la de regular el sueño; sin embargo también se le atribuye la capacidad de regular algunas funciones endocrinas y se piensa que quizás este regulado por los



corticoides^(292,293). Un trabajo realizado con mitocondrias de rata in-vitro demostró que este neuropeptido mejora la eficiencia de la fosforilación oxidativa⁽²⁹⁴⁾. En nuestro estudio, observamos que la expresión de éste neuropeptido disminuye en los animales que recibieron tratamiento, por lo que podemos hipotetizar que su actividad en el RC se encuentre relacionado con la inflamación y que de alguna manera influye en el sistema antioxidante.

Finalmente, en nuestro estudio, el tratamiento con O3 ha evitado o al menos retrasado de forma significativa la aparición a los 3 meses de RC en los pulmones trasplantados por su efecto antimicrobiano, antioxidante y probablemente también inmunosupresor, lo que abre una nueva alternativa de tratamiento y/o prevención de los pacientes trasplantados. Dado que es un fármaco que no produce efectos adversos, que es fácil de administrar y económico, desde el punto de vista traslacional supone una opción potencialmente aplicable al ser humano. Los futuros estudios experimentales a largo plazo y los ensayos clínicos que devengan nos ayudaran a confirmar esta singular aplicabilidad terapéutica del O3 en el TP.



CONCLUSIONES

Primera: “Los hallazgos macroscópicos mostraron que los pulmones trasplantados habían perdido la morfología pulmonar a los 3 meses convirtiéndose en un pequeño muñón fibrótico sin capacidad funcional. Mientras que los pulmones trasplantados y tratados con O₃ se observó que conservaban la estructura pulmonar y ventilatoria normal”.

Segunda: “Los hallazgos histológicos del grupo de animales trasplantados mostraron la presencia de un RC severo en todos los animales, mientras que en los pulmones de los animales trasplantados y tratados con O₃ no se observó la presencia de signos de RC, de forma en que el tratamiento con O₃ protege a los pulmones trasplantados del RC”.

Tercera: “Se comprobó por medio de la técnica de PCR-RT la presencia de genes relacionados con el estrés oxidativo en los pulmones de los animales trasplantados, mientras que se observó el efecto antioxidante y detoxificante del O₃ en la expresión génica de los pulmones de los animales que fueron tratados con O₃”.

Cuarta: “Los signos de angiogénesis y el edema que se desencadenan por la hipoxia resultante del TP influyen en la presentación del RC, y fue observado en este estudio que el ozono es capaz de regular e inhibir estos signos mediante el control de los genes Vegf-A, Klf-2, Thbd, Plvap y EPAS1.

Quinta: “Los genes Vegf-A y KLF2, tienen influencia sobre la acción de la COX-2, por lo que a pesar que no se ha reportado, el O₃ pudiera tener propiedades desinflamatorias, analgésicas y quizás antipiréticas; estos efectos podrían ser entonces tener sinergia con la administración de fármacos inhibidores selectivos de la COX-2”.

Sexta: “Se observó por medio de la técnica de PCR-RT que el ozono puede ser capaz de ejercer influencia sobre la homeóstasis celular, ya que regula los genes que son capaces del control del transporte de membrana y la concentración de solutos; mecanismos que mantienen la polaridad celular y de ésta manera inhibir el proceso de apoptosis relacionado al RC”.



Septima: *“En nuestro estudio, el tratamiento con O₃ ha evitado o al menos retrasado de forma significativa la aparición a los 3 meses de RC en los pulmones trasplantados por su efecto antimicrobiano, antioxidante y probablemente también inmunosupresor, este último hasta ahora no ha sido evaluado”.*

Octava: *“Desde el punto de vista traslacional; el ozono es un medicamento seguro, económico y de fácil administración y representa una alternativa de tratamiento para pacientes que han sido sometidos o van a ser sometidos a un TP”.*



BIBLIOGRAFIA

1. Sollinger H, D'Alessandro A, Deierhoi M, Kirk A. et al. Introducción al trasplante en Schwartz principios de cirugía, 7ª edición, Mc Graw Hill 2002, cap 10; 397-9.
2. Salvatierra Velázquez A. y Grupo de Trasplante Reina Sofía de Córdoba. Trasplante Pulmonar en España. Arch bronconeumol 2004; 40(56): 41-48.
3. Organización Nacional de trasplantes. Ministerio de Sanidad y Consumo, España. Estadística de donación de órganos y trasplantes. <http://www.msc.es>
4. Demikov V. Experimental transplantation of vital organ. New York: Consultants Bureau Enterprises, Inc. 1962.
5. Metras H. Preliminary note sur la greffe totale du poumon chez le chien. Proc Acad Sci 1950; 231: 1176-7.
6. Hardy J, Web W, Dalton M. Lung homotransplantations in man. JAMA 1963; 186: 1065-74.
7. Derom F, Barbier F, Ringoir S. Ten-month survival after lung homotransplantations. J. Thorac Cardiovasc Surg 1971; 61: 835-46.
8. Veith F, Richards K. Lung transplantation with simultaneous pulmonary artery ligation. Surg Gynec Obstet 1969; 129: 768-74.
9. Wildevuur C, Heemstra H, Tammeling G. Long-term observation of the changes in pulmonary arterial pressure after reimplantation of the canine lung. J Thorac Cardiovasc Surg 1968; 56: 799-808.
10. Noircler M, Chauvin G, Pons R. Problèmes techniques et de surveillance dans les transplantations pulmonaires d'après 120 expérimentations. Ann Chir Thor Cardiovasc 1969; 8: 215-22.
11. Levasseur P, Kulski M, Hay J. Contribution a l'étude des transplantations pulmonaires. Allo transplantations pulmonaires gauches avec ligature immédiate de l'artère pulmonaire droite. Ann Chir Thor Cardiovasc 1972; 11: 107-117.
12. Serrano F, Casillas M, García F. Trasplantes experimentales de pulmón. Rev Clin Esp 1968; 110: 225-33.
13. Huges-Jones P, Macarthur A, Cullum P. Lung transplantation in a patient with fibrosing alveolitis. Brit Med J 1971; 3: 391-3.
14. Veith F, Montefusco C. Lung Transplantation. En: Glen W editor. Thoracic and cardiovascular surgery. Norwalk: Appleton-Century-Crofts, 1983: 326-37.
15. Nelems J, Rebuck A, Cooper J. Human lung transplantation. Chest 1980; 78: 569-73.
16. Trummer M, Berg P. Lung transplantation. En: Thomas CC editor. Illinois: Springfield, 1970.
17. Veith F, Richards K. Improved technic for canine lung transplantations. Ann Surg 1970; 171: 553-8.
18. Lima O, Cooper JD, Peters WJ. Effects of methylprednisolone and azathioprine on bronchial healing following lung transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg. 1981; 82(2): 211-5.



19. Goldberg M, Lima G, Morgan E. A comparison between cyclosporine A and methylprednisolone plus azathioprine on bronchial healing following canine lung autotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 85: 821-6.
20. Dubois P, Choiniere L, Cooper JD. Bronchial omentopexy in canine lung allotransplantation. *Ann Thorac Surg* 1984; 38: 211-4.
21. The Toronto Lung Transplant Group. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *New Engl J Med* 1986; 314: 1140-5.
22. Cooper J, Pearson F, Patterson G. Technique of successful lung transplantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 93: 173-81.
23. Pearson F. Lung transplantation: the Toronto experience. *Eur J Cardiothorac Surg* 1989; 3: 6-11.
24. Dark J, Patterson G, Al-Jilaihawi A. Experimental en bloc double-lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1986; 42: 394-8.
25. Patterson G, Vooper J, Goldman B. Technique of successful clinical double lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1988; 45: 626-33.
26. Patterson G, Cooper J, Dark J. Experimental and clinical double lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 95: 70-4.
27. Patterson G, Todd T, Cooper J. Airway complications after double lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 99: 14-21.
28. Noirclerc M, Metras D, Vaillant A. Bilateral bronchial anastomosis in double lung and Herat-lung transplantation. *Eur J Cardio Thorac Surg* 1990; 4: 31: 314-7.
29. París F, López V. Etudes de la circulation bronchique dans les dilatations des bronches. *Les Bronches* 1969; 19: 466-72.
30. Pasque M, Cooper J, Kaiser L. Improved technique for bilateral lung transplantation: rational and initial clinical experience. *Ann Thorac Surg* 1990; 49: 785-91.
31. Kaiser L, Pasque M, Trulock E. Bilateral sequential lung transplantation: the procedure of choice for double-lung replacement. *Ann Thorac Surg* 1991; 52: 438-46.
32. Santana N. Modelo experimental de TP en ratas. Valoración del tratamiento de antioxidants sobre la lesión de isquemia-reperfusión. Tesis doctoral, ULPGC 2003.
33. García R. Una aproximación al estudio molecular del rechazo crónico en el TP experimental mediante la tecnología de DNA microarrays. Tesis doctoral ULPGC 2009.
34. Marck KW, Wildevuur CR. Lung transplantation in the rat: I. Technique and survival. *Ann Thorac Surg* 1982; 34(1): 74-80.
35. Mizuta T, Kawaguchi A, Kazuya N. Simplified rat lung transplantation using cuff technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 97: 578-81.



36. Shiraishi T, Mizuta T, DeMeester S. Effect of ischemic injury on subsequent rat lung allograft rejection. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 947-51.
37. Reis A, Giaid A, Serrick C. Improved outcome of rat lung transplantation with modification of the non suture external cuff technique. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14: 274-9.
38. Santana N, Santisteban P, López A, Clavo B, Ponce M, Rodríguez JC, García JM, et al. Technical modifications of the orthotopic lung transplantation model in rats with brain death donors. *Arch Bronconeumol* 2011; 47(10): 488-494
39. Date H, Hace M, Sano Y, Nagahiaro I, Miyaki K, et al. Improved survival after living lobar donor transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004, 128(6): 933-940.
40. Orens JB, Estenne M, Arcasoy S et al. International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update a consensus report from the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006;25(7):745-755.
41. Solé. Indicaciones de TP y selección del receptor. En: V. Calvo editor. *El trasplante pulmonar*. Valencia: Consejería de Sanidad. Generalitat Valenciana, 2001: 23-31.
42. Smith C. Patient selection, evaluation, and preoperative management for lung transplant candidates. *Clin Chest Med* 1997;18: 183-97.
43. Patterson GA. Indications. Unilateral, bilateral, heart-lung and lobar transplant procedures. *Clin Chest Med* 1997; 18: 225-30.
44. De SA, Meachery G, Hester KL et al. Lung transplantation for patients with cystic fibrosis and *Burkholderia cepacia* complex infection: a single-center experience. *J Heart Lung Transplant* 2010;29(12):1395-1404.
45. Galie N, Hoeper MM, Humbert M et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2009;34(6):1219-1263.
46. Stilwell PC, Mallory GB. Pediatric lung transplantation. *Clin Chest Med* 1997; 18: 405-14.
47. The American Society for Transplant Physicians (ASTP)/American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS)/International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). International guidelines for the selection of lung transplant candidates. *Am J. Respir Crit Care Med* 1998; 158: 335-9.
48. Hosenpud JD, Bennet LE, Berkeley MK. The registry of the International Society for heart and lung transplantation: seventeenth official report 2000. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: 909.
49. Minai OA, Maurer JR, Kesten S. Comorbidities in end-stage lung disease. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18: 89-93.
50. Hopkinson DN, Bhabra MS, Hooper TL. Pulmonary graft preservation: a worldwide survey of current clinical practice. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17: 525-31



51. Cooper JD, Patterson GA, Trulock EP. Results of single and bilateral lung transplantation in 131 consecutive recipients. Washington University Lung Transplant Group. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 107: 460-70.
52. Sundaresan S, Trachiotis GD, Aoe M. Donor lung procurement: assessment and operative technique. *Ann Thorac Surg* 1993; 56: 1409-13.
53. Orens JB, Boehler A, De PM, et al. A review of lung transplant donor acceptability criteria. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22(11): 1183-1200.
54. Shimada K, Kondo T, Okada Y. Lung transplantation from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 2000; 32: 279-80.
55. D'Alessandro AM, Hoffman RM, Knechtle SJ. Controlled non-heart-beating donors: a potential source of extrarenal organs. *Transplant Proc* 1995; 27: 707-9.
56. Mallory GB Jr, Cohen AH. Donor considerations in living related donor lung transplantation. *Clin Chest Med* 1997; 18: 239-44.
57. Gridelli B, Remuzzi G. Strategies for making more organs available for transplantation. *N Engl J Med* 2000; 343: 404-10.
58. Woo MS, MacLaughlin EF, Horn MV. Living donor lobar lung transplantation: the pediatric experience. *Pediatr Transplant* 1998; 2: 185-90.
59. Platt JL. Prospects for xenotransplantation. *Pediatr Transplant* 1999; 3: 193-200.
60. Guidelines for the determination of death. Report of the medical consultants on the diagnosis of death to the President's Commission for the study of ethical problems in Medicine and Biomedical and Behavioural Research. *Jama* 1981; 246: 2184-6.
61. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM. The Registry of the International Society for Heart and Lung transplantation: sixteenth official report. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18: 611-26.
62. Khan SU, Salloum J, O'Donovan PB. Acute pulmonary edema after lung transplantation: the pulmonary reimplantation response. *Chest* 1999; 116: 187-94.
63. King RC, Binns OA, Rodríguez F. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 1681-5.
64. Schulman LL. Perioperative mortality and primary graft failure. *Chest* 1998; 114: 7-8.
65. Matesanz R, Miranda B, Felipe C. Organ procurement in Spain: the impact of transplant coordination. *Clin Transplant* 1994; 8: 281-6.
66. Egan TM. Selection and management of the lung donor. En: Patterson GA, Couraud L, editores. *Lung Transplantation*. Amsterdam: Elsevier, 1995: 103-15.
67. Calvo V. Selección y mantenimiento del donante pulmonar. En: V. Calvo editor. *El trasplante pulmonar*. Valencia: Consejería de Sanidad. Generalitat Valenciana, 2001: 33-44.



68. Wijnen RM, Boosner HM, Nieman FH, Daemen JH, Heineman E, Kootstra G. Retrospective analysis of the outcome of transplantation of non-heart-beating donor kidneys. *Transplant proc* 1995; 27(5): 2945-2946; discussion 35-9.
69. Casavilla A, Ramírez C, Shapiro R, Nghiem D, Miracle K, Fung JJ, et al. Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. *Transplant proc* 1995; 27(5): 2898.
70. Ploeg RJ, VdVA workshop international. *Transplant proc* 1995; (79): 997-982.
71. BOE. Real decreto 30 diciembre. Colección de órganos. España 1999.
72. Sánchez-Fructuoso AI, de Miguel Marquez M, Prats D, Barrientos A. Non-heart-beating donors: experience from the hospital clinic of Madrid. *J Nephrol* 2003; 16(3): 387-392.
73. Cooper JD. The lung donor: special considerations. *Transplant Proc* 1988; 20: 17-8.
74. Judson MA. Clinical aspects of lung transplantation. *Clin Chest Med* 1993; 14: 335-57.
75. Herridge MS, De Hoyos AL, Chaparro C. Pleural complications in lung transplant recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110:22-6.
76. Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The registry of the International Society of Heart and Lung Transplantation: Twenty-seventh official adult lung and heart-lung transplant report 2010. *Heart Lung Transplant* 2010; 29(10): 1104-1118.
77. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM. The Registry of the International Society for Heart and Lung transplantation: eighteenth official report-2001. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20: 805-15.
78. Gross C, Savik R, Bolman RM. Long term health status and quality of life outcomes of lung transplant recipients. *Chest* 1995; 108: 1587-93.
79. Morales Marín P. Resultados del trasplante pulmonar. En: V. Calvo editor. El trasplante pulmonar. Valencia: Consejería de Sanidad. Generalitat Valenciana, 2001: 149-57.
80. Ferrer J, Roldan J, Roman A, Bravo C, Monforte V, et al. Acute and chronic pleural complications in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22(11): 1217-1225.
81. Gómez F, Planas A, Ussetti J, et al. Factores pronósticos de morbilidad en el post-operatorio inmediato del trasplante pulmonar. *Arch bronconeumol* 2003; 39(8): 353-360.
82. Gammie JS, Cheul L, Pham SM. Cardiopulmonary bypass is associated with early allograft dysfunction but not death after double-lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115: 990-7.
83. Kelly WF, Sanghani S, BarnettSD, Burton N, Nathan S. significance of early bronchoscopic airway abnormalities after lung transplantation. *J Heart lung transplant* 2003; ; 22(5): 583-586.
84. Mulligan MS. Endoscopic management of airway complications after lung transplantation. *Chest Surg Clin N Am* 2001; 11(4): 907-15.
85. Saad CP, Ghamande SA, Minai OA, Murthy S, Petterson G, et al. The role of self-expandible metallic stents for the treatment of airway complications after lung transplantation. *Transplantation* 2003-15; 75(9): 1532-1538.



86. Calvo Medina V. Complicaciones del trasplante pulmonar. En: V. Calvo editor. El trasplante pulmonar. Valencia: Consejería de Sanidad. Generalitat Valenciana, 2001: 91-106.
87. Clark SC, Levine AJ, Hasan A. Vascular complications of lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1996; 61: 1079-82.
88. De Perrot M, Liu M, Waddell T. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am Resp J Crit Care Med* 2003; 167: 490-511.
89. Chatila W, Furukawa S, Gauhhan J, et al. Respiratory failure after lung transplantation. *Chest* 2003; 123(1): 165-173.
90. Rocco M, Conti G, Antonelli M, Bufy M, Costa MG, Alampi D, et al. Non-invasive pressure support ventilation in patients with acute respiratory failure after bilateral lung transplantation. *Intensive Care Med* 2001, 27(10): 1622-1626.
91. Schulman LL, Weinberg A, McGregor C, et al. Influence of lung injury on early postoperative surgery after lung transplantation. *Ann Transplant* 2000; 5(3): 20-25.
92. Solé Jover A. El rechazo pulmonar agudo y crónico. En: V. Calvo editor. El trasplante pulmonar. Valencia: Consejería de Sanidad. Generalitat Valenciana, 2001: 127-139.
93. King-Biggs MB. Acute pulmonary allograft rejection. Mechanism, diagnosis and management. *Clin Chest Med* 1997; 18: 301-10.
94. Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest* 1998; 114: 51-60.
95. Guilinger RA, Paradis IL, Dauber JH. The importance of bronchoscopy with transbronchial biopsy and bronchoalveolar lavage in the management of lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 2037-43.
96. Sarahrudi K, Carretta A, Wisser W. The value of switching from cyclosporine to tacrolimus in the treatment of refractory acute rejection and obliterative bronchiolitis after lung Transpl *In* 2002; 15: 24-8.
97. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, et al. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterata syndrome. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1041-1047.
98. Thabut G, Vinatier I, Brugiere O, Leseche G, Loirat P, et al. Influence of preservation solution on early graft failure in clinical lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1204-1208.
99. Chen F, Nakamura T, Wada H. Development of a new organ preservation solutions in Kyoto University. *Yonsei Med J* 2004-31; 45(6): 1107-14.
100. Aziz TM, Pillay TM, Corris PA, Forty J, Hilton CJ, Hasan A, et al. Perfadex for clinical lung procurement: it is an advance?. *Ann Thorac Sur* 2003; 75(3): 990-995.
101. Kotloff RM, Ahya VN. Medical complications of lung transplantation. *Eur Respir J* 2004: 23(2): 334-342.



102. Kramer MR, Marshall SE, Starnes VA. Infectious complications in heart-lung transplantation. Analysis of 200 episodes. *Arch Intern Med* 1993; 153: 2010-6.
103. Maurer JR, Tullis DE, Grossman RF. Infectious complications following isolated lung transplantation. *Chest* 1992; 101: 1056-9.
104. Román A, Bravo C, Levy G. Isoniazid prophylaxis in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: 903-6.
105. Flume P, Egan T, Paradowsky L, Detterbeck F, Thompson J, Patterson GA, et al. Infectious complications of lung transplantation. Impact of cystic fibrosis. *Am J Respir Critical Care Med* 1994; 149(6): 1601-1607.
106. Ettinger NA, Bailey TC, Trulock EP. Cytomegalovirus infection and pneumonitis. Impact after isolated lung transplantation. Washington University Lung Transplant Group. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1017-23.
107. Bonatti H, Tabarelli W, Ruttman E, Kafka R, et al. Impact of cytomegalovirus match on survival after cardiac and lung transplantation. *Am Surg* 2004; 70: 710-714.
108. Luckraz H, Sharples L, McNeil K, Wreghitt T, et al. Cytomegalovirus antibody status of donor/recipient does not influence the incidence of bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22(3): 287-291.
109. Jacobs F, Knoop C, Brancart F, Gilot P, Melot C, et al. Human Herpesvirus-6 infection after lung and heart lung transplantation: a prospective longitudinal study. *Transplantation* 2003; 75: 1996-2001.
110. Flynn JD, Akers WS, Jones M, Stevkovic N, Waid T, et al. Treatment of respiratory syncytial virus pneumonia in a lung transplant recipient: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy* 2004; 24(7): 932-938.
111. McCurdy LH, Milstone A, Dummer S. Clinical features and outcomes of paramyxoviral infection in a lung transplant recipients treated with ribavirin. *Heart Lung Transplant* 2003; 22: 745-753.
112. Billings JL, Hertz MI, Savik K, Wendt CH. Respiratory viruses and chronic rejection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(5): 559-566.
113. Morales P, Torres J, Salavert M, Peman J, La Cruz J, Sole A. Visceral leishmaniasis in lung transplantation. *Transplant proc* 2003; 35: 2001-2003.
114. Nielsen TD, Bahnson T, Davis RD, Palmer SM. Atrial fibrillation after pulmonary transplant. *Chest* 2004; 126: 496-500.
115. Gandhi S, Bromberg B, Mallory G, et al. Atrial flutter: a newly recognized complication of pediatric lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112(4): 984-991.
116. Haas M, Kletzmayer J, Staudinger T, Bohmig G, Mayer G, et al. Hypothyroidism is a cause of tacrolimus intoxication and acute renal failure: a case report. *Wien Klin Wochenschr* 2000; 112: 939-941.



117. De Boer WJ, Hepkema BG, Loeff BG, Van Der Bij W, et al. Survival benefit of cardiopulmonary bypass support in bilateral lung transplantation for emphysema patients. *Transplantation* 2002; 73: 1621-1627.
118. Sharples LD, McNei K, Stewart S. Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21: 271-81.
119. Sundaresan S. Bronchiolitis obliterans. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 10: 221-6.
120. Mordecai B. The history of ozone. The Schönbein period 1839-1868. *Bull Hist Chem* 2001; 26(1):
121. Bocci V. Physical-chemical properties of ozone. In *Ozone: a new medical drug*. 2ª edición, Springer 2011; cap 1: 1-4.
122. Molina MJ, Rowland FS. Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom catalyzed destruction of ozone. *Nature* 1974; 249: 810-814.
123. Schroppe M. Successes in fight to save ozone layer could close holes by 2050. *Nature* 2000; 408:627.
124. Devlin RB, McDonnell WF, Mann R, Becker S, House DE, Schreinemachers D, Koren HS. Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung. *Am J Resp: Cell Mol Biol* 1991; 4: 72-81.
125. Aris RM, Christian D, Hearne PQ, Kerr K, Finkbeiner WE, Balmes JR. Ozone-induced airway inflammation in human subjects as determined by airway lavage and biopsy. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1363-1372.
126. Broeckeaert F, Aarslane K, Hermans C, Bergamaschi E, Brustolin A, Mutti A, Bernard A. Lung epithelial damage at low concentrations of ambient ozone. *Lancet* 1999; 353: 900-901.
127. Babior BM, Takeuchi C, Ruedi J, Gutiérrez A, Wentworth P Jr. Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3031-3034.
128. Nieva J, Wentworth P Jr. The antibody-catalyzed water oxidation pathway- a new chemical arm to immune defense?. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 274-278.
129. Bocci V. How does ozone act? How and why can we avoid ozone toxicity?. In *Ozone: a new medical drug*. 2ª edición, Springer 2011; cap 4: 17-25.
130. Bocci V. How ozone is generated and its concentrations measured?. In *Ozone: a new medical drug*. 2ª edición, Springer 2011; cap 2: 5-8.
131. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994; 52: 253-265.
132. Kowaltowski AJ, De Souza-Pinto NC, Castilho RF, et al. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(4): 333-343.
133. Bocci V, Di Paolo N. Oxygen-ozone therapy in medicine: an update. *Blood Purif* 2009; 28: 373-376.
134. Travagli V, Zanardi I, Bernini P, et al. Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood. *Int J Toxicol* 2010b; 29: 165-174.



135. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 935-941.
136. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Fanetti G. Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. *Mediators Inflamm* 7: 313-317.
137. Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. *J Biochem Mol Toxicol* 2006; 20: 133-138.
138. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 64: 97-112.
139. Pullar JM, Vissers MC, Winterbourn CC. Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells. *IUBMB. Life* 2000; 50: 259-266.
140. Hooper DC, Scott GS, Zborek A, Mikheeva T, Kean RB, Koprowski H, Spitsin SV. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CSN barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J* 2000; 14: 691-698.
141. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81-128.
142. Antunes F, Cardenas E. Estimation of hydrogen peroxide gradient across biomembranes. *FEBS Lett* 2000; 475: 121-126.
143. Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 243-270.
144. Forman HJ. Hydrogen peroxide: the good, the bad and the ugly, in *Oxidants in Biology* (G. Valacchi, P. Davis eds), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp-17.
145. Bocci V, Luzzi E, Corradeschi F, Paulesu L, Di Stefano A. Studies on the biological effects of ozone: 3. An attempt to define conditions for optimal induction of cytokines. *Lymphokine Cytokine Res* 1993a; 12: 121-126.
146. Bocci V, Luzzi E, Corradeschi F, Paulesu L, Rossi R, Cardaioli E, Di Simplicio P. Studies on the biological effects of ozone: 4. Cytokine production and glutathione levels in human erythrocytes. *J Biol Regul Homeost Agents* 1993b; 7: 133-138.
147. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Aldinucci C, Silvestri S, Paccagnini E, Gerli R. Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood ozone. *J Biol Regul Homeost Agents* 1998a; 12: 67-75.
148. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000a; 486: 10-13.
149. Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action?. *Free Radic Res* 2000b; 33: 819-830.
150. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179.



151. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336:1066-1071.
152. Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* 2000; 53: PE1, October 10.
153. Bocci V, Paulesu L. Studies on the biological effects of ozone 1. Induction of interferon gamma on human leucocytes. *Haematological* 1990; 75: 510-515.
154. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol* 2002; 3: 1129-1134.
155. Bocci V, Borrelli E, Valacchi G, Luzzi E. Quasi-total-body exposure to an oxygen-ozone mixture in a sauna cabin. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1999a; 80: 549-554.
156. Valacchi G, Bocci V, Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediators Inflamm* 2000; 9: 271-276.
157. Bocci V. Ossigeno-ozono terapia. Casa Editrice Ambrosiana 2000; Milano, pp. 1-324 .
158. Mendiratta S, Qu Z-C, May JM. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. *Free Radic Biol Med* 1998a; 24: 789-797.
159. Mendiratta S, Qu Z-C, May JM. Enzyme-dependent ascorbate recycling in human erythrocytes: role of thioredoxin reductase. *Free Radic Biol Med* 1998b; 25: 221-228.
160. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 2008; 28: 569-631.
161. Dianzani MU. 4-hydroxynonenal and cell signaling. *Free Radic Res* 1998; 28: 553-560.
162. Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU. 4-hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antiox Redox Signal* 1999; 1: 255-284.
163. Bosch-Morell F, Flohe L, Marin N, Romero FJ. 4-hydroxynonenal inhibits glutathione peroxidase: protection by glutathione. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1383-1387.
164. Larine A, Bianchi L, Bocci V. Effects of 4-hydroxynonenal on antioxidant capacity and apoptosis induction in Jurkat T cells. *Free Radic Res* 2004; 38: 509-516.
165. Aldini G, Gamberoni L, Orioli M, et al. Mass spectrometric characterization of covalent modifications of human serum albumin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal. *J Mass Spectrom* 2006; 41: 1149-1161.
166. Aldini G, Vistoli G, Regazzoni L, et al. Albumin is the main nucleophilic target of human plasma: a protective role against pro-atherogenic electrophilic reactive carbonyl species?. *Chem. Res Toxicol* 2008; 21: 824-835.
167. Yamamoto Y. Fate of lipid hydroperoxides in blood plasma. *Free Radic Res* 2000; 33: 795-800.
168. Siems W, Grune T. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* 2003; 24: 167-175.



169. Awasthi YC, Ansari GA, Awasthi S. Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferase. *Methods Enzymol* 2005; 401: 379-407.
170. Alary J, Geuraud F, Cravedi JP. Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways. *Mol Aspects Med* 2003; 24: 177-187.
171. Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm* 2004; 13: 3-11.
172. Chow CK, Kaneko JJ. Influence of dietary vitamin E on the red cells of ozone-exposed rats. *Environ Res* 1979; 19: 49-55.
173. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999a; 31: 261-272.
174. Halliwell B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea?. *Trends Biochem Sci* 1999b; 24: 255-259.
175. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001; 18: 685-716.
176. Frei B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 196-204.
177. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 1989; 264: 13963-13966.
178. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274: 532-538.
179. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275: 218-220.
180. Packer L, Roy S, Sen CK. Alpha-lipoic acid: a metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 79-101.
181. Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Trischler H, Packer L, Rihn BH. A-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1023-1039.
182. Chae HZ, Kim K, Kim IH. The novel antioxidant enzyme, thioredoxin peroxidase, and mammalian peroxiredoxins. In *Redox regulation of cells signaling and its clinical application* (L Packer, J Yodoi, Eds), Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp 85-92.
183. Bocci V. How is ozone administered?. In *Ozone: a new medical drug*. 2ª edición, Springer 2011; cap 5: 27-33.
184. Schulz S, Haussler U, Mandic R, et al. Treatment with ozone/oxygen-pneumoperitoneum results in complete remission of rabbit squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2008; 122: 2360-2367.
185. Bocci V. Does ozone really "cure" cancer? *Int J Cancer* 2008; 123: 1222.
186. Stadlbauer TH, Eisele A, Heidt MC, et al. Preconditioning with ozone abrogates acute rejection and prolongs cardiac allograft survival in rats. *Transplant Proc* 2008; 40: 974-977.



187. Werkmeister H. Dekubitalgeschwüre und die Behandlung mit der Ozon-Underdruckbegasung, in Ozon-Handbuch. Grundlagen. Prävention Therapie (EG Beck, R Viebahn-Hänsler, Eds). Ecomed, Landsberg, p V-7.1 1-V-7.1 22.
188. Bertoletti A, Izzo A. Oxygen-ozone treatment of Buruli ulcer. Riv Ital ossigeno Ozonoterapia 2006; 5: 129-134.
189. Borrelli E, Iabichella ML, Mosti G, Bocci V. Topical ozonated autohaemotherapy for the treatment of skin lesions. Int J Ozone Ther 2008; 7: 103-107.
190. Faus Vitoria J. El ozono y los factores de crecimiento en la curación de úlceras. Riv It ossigeno Ozonoterapia 2006; 5: 41-46.
191. Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. Science 1997. 276: 75-81.
192. Bocci V. Ipotetici meccanismo di azione dell'ozono nel trattamento del conflitto discoradicolare, in Lombalgie e lombosciatalgie. Criteri di diagnosi e cura. 1998a; (Ceccherelli C, Ricciardi A, eds). Edizioni Libreria Cortina, Torino. 331-340.
193. Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. Lab Invest 1990; 62: 670-679.
194. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. Proc Natl Acad Sci 1993; USA 90: 7915-7922.
195. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. Proc Natl Acad Sci 1988; USA 85: 6465-6467.
196. Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, Walter P, Yaffee M. Oxidants in mitochondria: from physiology to disease. Biochim. Biophys. Acta 1995; 1271: 67-74.
197. Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. Proc Natl Acad Sci 1995; USA 92: 6264-6268.
198. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem J 1996; 313: 17-29.
199. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 514-519.
200. Van der Zee J, Van Beek E, Dubbelman TMAR, Van Steveninck J. Toxic effects of ozone on murine L929 fibroblasts. Biochem J 1987; 247: 69-72.
201. Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. J Biol Chem 1991; 266: 2005-2008.
202. Goldstein BD, Balchum OJ. Effect of ozone on lipid peroxidation in the red blood cell. Proc Soc Exp Biol Med 1967; 126: 356-359.
203. Freeman BA, Miller BE, Mudd JB. Reaction of ozone with human erythrocytes, in Assessing toxic effects of environmental pollutants (Lee SD, Mudd JB eds), Ann arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI, 1979. Pp 151-171.



204. Bocci V. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today. *J Biol Regul Homeost Agents* 1996b; 10: 31-53.
205. Bocci V. Oxygen-ozone therapy, a critical evaluation, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht 2002.
206. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem?. *FEBS Lett* 2003; 540: 3-6.
207. Larini A, Bianchi L, Bocci V. The ozone tolerance: (I) Enhancement of antioxidant enzymes is ozone dose-dependent in Jurkat cells. *Free Radic Res* 2003; 37: 1163-1168.
208. Galleano M, Puntarulo S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; 1271: 321-326.
209. Leist M, Raab B, Maurer S, Brigelius-Flohé R. Conventional cell culture media do not adequately supply cells with antioxidants and thus facilitate peroxide-induced genotoxicity. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 297-306.
210. Matos HR, Di Mascio P, Medeiros MH. Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch. Biochem. Biophys* 2000; 383: 56-59.
211. Dumaswala UJ, Wilson MJ, Wu YL, Wykle J, Zhuo L, Douglass LM, Daleke DL. Glutathione loading prevents free radical injury in red blood cells after storage. *Free Radic Res* 2000; 33: 517-529.
212. Merz T, Bender MA, Kerr HD, Kulle TJ. Observations of aberrations in chromosomes of lymphocytes from human subjects exposed at a concentration of 0.5 ppm for 6 and 10 hours. *Mutat Res* 1975; 3: 299-302.
213. Tarkington BK, Duvall TR, Last JA. Ozone exposure of cultured cells and tissues. *Meth Enzymol* 1994; 234: 257-265.
214. Foksinski M, Bialkowski K, Skiba M, Ponikowska I, Szmurlo W, Olinski R. Evaluation of 8-oxodeoxyguanosine, typical oxidative DNA damage, in lymphocytes of ozonetreated arteriosclerotic patients. *Mutat Res* 1999; 438: 23-27.
215. Kleeberger SR, Levitt RC, Zhang LY, Longphre M, Harkema J, Jedlicka A, Eleff SM, Di Silvestre D, Holroyd KJ. Linkage analysis of susceptibility to ozone-induced lung inflammation in inbred mice. *Nat Genet* 1997; 17: 475-478.
216. Cho HY, Zhang LY, Kleeberger SR. Ozone-induced lung inflammation and hyperreactivity are mediated via tumor necrosis factor-alpha receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: L537-L546.
217. Fabris G, Tommasini G, Petralia B, Lavaroni A, De Nardi F, De Luca G, Biasizzo E, Iaiza F. L'ossigeno-ozono terapia intra foraminale. *Riv Neuroradiol* 2001; 14: 61-66.
218. Alexandre A, Pentimalli L, Rigobello L, Coró N. Amaurosi fugax in un caso di discoliosis cervicale mediante O₂-O₃ in L'ozonoterapia nel 2000 (F. Ceccherelli, F. Giron, eds) Edizioni Libreria Cortina, Torino, pp 141-144.



219. Bocci V. The potential toxicity of ozone: side effects and contraindications of ozonotherapy?. In *Ozone: a new medical drug*. 2ª edición, Springer 2011; cap 7: 75-84.
220. Mc Donnell WF. Intersubject variability in human acute ozone responsiveness. *Pharmacogenetics* 1991; 1: 110-113.
221. Prows DR, Shertzer HG, Daly MJ, Sidman CL, Leikauf GD. Genetic analysis of ozone-induced acute lung injury in sensitive and resistant strains of mice. *Nat Genet* 1997; 17: 417-474.
222. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993; 84: 407-412.
223. Hernández FA. To what extent does ozone therapy need a real biochemical control system? Assessment and importance of oxidative stress. *Arch Med Res* 2007; 38: 571-578.
224. Bocci V. Can ozonotherapy be performed if the biochemistry of the process cannot be controlled?. *Arch Med Res* 2007a; 38: 584-585.
225. Shiba M, Tadokoro K, Sawanobori M, Nakajima K, Suzuki K, Juji T. Activation on the contact system by filtration of platelet concentrates with a negatively charged white cell-removal filter and measurement of venous blood bradykinin level in patients who received filtered platelets. *Transfusion* 1997; 37: 457-462.
226. Abe H, Ikebuchi K, Shimbo M, Sekiguchi S. Hypotensive reactions with a white cell-reduction filter: activation of kallikrein-kinin cascade in a patient. *Transfusion* 1998; 38: 411-412.
227. Mc Connell R, Berhane K, Gilliland F, London SJ, Islam T, Gauderman WJ, Avol E, Margolis HG, Peters JM. Asthma in exercising children exposed to ozone: a cohort study. *Lancet* 2002a; 359: 386-391.
228. Bocci V. Administration of interferon at night may increase its therapeutic index. *Cancer Drug Del* 1985b; 2: 313-318.
229. Cummins RO. *Textbook of advance cardiac life support*, Scientific Publishing American Heart Association, Dallas TX. 1994.
230. Jacobs MT. *Untersuchung uber Zwischenfalle und typische komplikationen in der Ozon-Sauerstofftherapie*. *OzoNachrichten* 1982; 1:5.
231. Santana N, Martin JL, López A, Rodríguez P, Ponce M, Fleixinet J. Lung transplantation in rats: a viable experimental model. *Arch Bronconeumol* 2004; 40(10): 438-442.
232. Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Rev Sci Tech* 2005; 24: 503-513.
233. *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Reseach Council (US). Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals. 8º Ed, Washington, DC; 2011.
234. *Laboratory animal medicine*. James G Fox, Lynn C Anderson, Franklin M Loew, Fred W Quimby Editors, 2º Ed; Elsevier; American college of laboratory animal medicine series; 2002. San Diego, California.



235. Nicklas W, Baneux P, Boot R, et al. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory animals* 2002; 36: 20-42.
236. Zúñiga JM, Tur Marí JA, Milocco SN, Piñeiro R. *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. Mc Graw Hill Interamericana de España. Madrid 2001.
237. Hedenqvist P, Roughan JV, Flecknell PA. Effects of repeated anaesthesia with ketamine/medetomidine and of pre-anaesthetic administration of buprenorphine in rats. *Lab Anim* 2000; 34(2): 207-211.
238. Jang HS, Choi HS, Lee SH, Jang KH, Lee MG. Evaluation of the anaesthetic effects of medetomidine and ketamine in rats and their reversal with atipamezole. *Vet Anaesth Analg* 2009; 36(4): 319-327.
239. Jang HS, Lee MG. Atipamezole changes the antinociceptive effects of butorphanol after medetomidine-ketamine anaesthesia in rats. *Vet Anaesth Analg* 2009; 36(6): 591-596.
240. Weksler B, NgB, Lenert J, Burt MA. Simplified method for endotracheal intubation in the rat. *J Appl Physiol* 1994; 76(4): 1823-1825.
241. Kolkert JL, 't Hart NA, Van Dijk A, Ottens PJ, Ploeg RJ, Leuvenink HG. The gradual onset brain death model: a relevant model to study organ donation and its consequences on the outcome after transplantation. *Lab Anim* 2007; 41(3): 363-371.
242. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Laskowski I, Tilney NL. A model of gradual onset brain death for transplant-associated studies in rats. *Transplantation* 2000; 69(3): 427-430.
243. Bos EM, Schuurs TA, Kraan M, Ottens PJ, et al. Renal expression of heat shock proteins after brain death induction in rats. *Transpl Proc* 2005; 37: 359-60.
244. Kolkert JL, 't Hart NA, Van Dijk A, Ottens PJ, Ploeg RJ, Leuvenink HG. The gradual onset brain death model: a relevant model to study organ donation and its consequences on the outcome after transplantation. *Lab Anim* 2007; 41(3): 363-371.
245. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Laskowski I, Tilney NL. A model of gradual onset brain death for transplant-associated studies in rats. *Transplantation* 2000; 69(3): 427-430.
246. Bos EM, Schuurs TA, Kraan M, Ottens PJ, et al. Renal expression of heat shock proteins after brain death induction in rats. *Transpl Proc* 2005; 37: 359-60.
247. Bocci V. Autohaemotherapy after of blood with ozone. A reappraisal. *J Int Med Res* 1994; 22: 131-144.
248. Borrego A, Zamora ZB, González R, et al. Protection by ozone preconditioning is mediated by the antioxidant system in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Mediators Inflamm* 2004; 13:13-9.
249. Clavo B, Catala L, Pérez JL, et al. Ozone therapy on cerebral blood flow: a preliminary report. *Evid Based Complement Alternat Med* 2004; 1: 315-319.
250. Clavo B, Pérez JL, López L, et al. Effects of ozone therapy on muscle oxygenation. *J Altern Complement Med* 2003; 9: 251-256.



251. Current protocols in molecular biology. Frederick M Ausubel, Roger Brent, Robert E Kingston, David Moore, J. G. Seidman, Kevin Struhl. John Wiley & Sons editors; 2004.
252. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-159.
253. Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol* 2005; 175: 6257-6273.
254. Sok LY, Young KA, Choi J, et al. Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Mol Endocrinol* 2008; 22(9): 2176-2189.
255. Santana-Rodríguez N, García Herrera R, Clavo B, et al. Searching for novel molecular targets of chronic rejection in an orthotopic experimental lung transplantation model. *J Heart Lung Transplant* 2012; 31(2): 213-221.
256. Cohen G, Hochstein P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry* 1963; 2: 1420-28.
257. Maddipati KR, Marnett LJ. Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1987; 262:17398-17403.
258. Takashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H. purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1987; 256: 677-686.
259. Jain JK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9(6): 685-693.
260. Mukhopadhyay D, Zeng H, Bhattacharya R. Complexity in the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF)-receptors signaling. *Mol Cell Biochem* 2004; 264 (1-2): 51-61.
261. Bhattacharya R, Senbanerjee S, Lin Z, et al. Inhibition of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by the krüppel-like factor 2 (KLF2). *J Biol Chem* 2005; 280(32): 28848-51.
262. Kim I, Oh JL, Ryu YS, et al. Angiopoietin-1 negatively regulates expression and activity of tissue factor in endothelial cells. *FASEB J* 2002; 16(1): 126-8.
263. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* 2001; (112): re 21.
264. Feinberg MW, Linz Z, Fish S, Jain MK. An emerging role for krüppel-like factor in vascular biology. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14(6): 241-6.
265. Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 699-676.
266. Hellwig-Bürigel T, Stiehl DP, Wagner AE, et al. Review: hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res* 2005; 25(6): 297-310.



267. Godzich M, Hod Nett M, Frank JA, Su G, et al. Activation of the stress protein response prevents the development of pulmonary edema by inhibiting VEGF cell signaling in a model of lung ischemia-reperfusion injury in rats. *FASEB J* 2006; 20(9): 1519-1521.
268. Krenn K, Klepetko W, Tagharis. Vascular endothelial growth factor increase pulmonary vascular permeability in cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007; 32(1): 35-41.
269. Anderson KP, Kern CB, Crable SC, Lingrel JB. Isolation of gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid krüppel-like factor: identification of a new multigene family. *Mol Cell Biol* 1995; 15(11): 5967-5965.
270. Kuo CT, Veselits ML, Barton KP, Lu MM, Cledenin C, Leiden JM. The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis. *Genes Dev* 1997; 11(22): 2996-3006.
271. Sen Banejee S, Lin Z, Atkins GB, Greif DM, et al. KLF2 is a novel transcriptional regulation of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med* 2004; 199(10): 1305-1315.
272. Ding B-S, Hong N, Christofidou-Solomidou M, et al. Anchoring fusion thrombomodulin to the endothelial lumen protects against injury-induced lung thrombosis and inflammation. *An J Resp Critical Care Med* 2009; 180: 247-256.
273. Saito H, Maruyama I, Shimazaky S, Yamamoto Y, et al. Efficacy and safety of recombinant human soluble thrombomodulin (art-123) in disseminated intravascular coagulation: results of phase III, randomized, double-blind clinical trial. *J Thromb Haemost* 2007; 5:31-41.
274. Cone JB, Thomas MD, Ferrer J, et al. Alterations in endothelial thrombomodulin expressions in zymosan-induced lung injury. *J Trauma* 2003; 54(4): 731-736.
275. Cone BC, Gambling TM, Boucher RC, et al. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L1166-L1178.
276. Ballart ST and Taylor AE. Bioelectric properties of proximal bronchiolar epithelium. *Am J Physiol Lung cell Moll Physiol* 1994; 267: L79-L84.
277. Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, et al. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor α by phosphorylation. *J Biol Chem* 1999; 274(27): 18947-18956.
278. Wood KL, Nunley DR, Moffatt-Bruce S, et al. The role of heat shock protein 27 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2010; 29: 786-791.
279. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, et al. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 1998; 12: 3320-3324.
280. Tian H, McKnight SL, Russel DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997; 11: 72-82.
281. Carson-Walter EB, Hampton J, Shue E, et al. Plasmalemmal vesicle associated protein-1 is a novel marker implicated in brain tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7643-7650.



282. Hnasco R, Mc Farland M, Ben-Jonathan N. distribución and characterization of plasmalemma vesicle protein-1 in rat endocrine glands. *J Endocrinol* 2002; 175: 649-661.
283. St Croix B, Rago C, Velculescu V, et al. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 2000; 289:1197-1202.
284. deMello DE, Heyman S, Phelps DS, Floros J. Immunogold localization of SP-A in lungs of infants dying from respiratory distress syndrome. *Am J Pathol* 1993; 142(5): 1631-1640.
285. Moore KJ, D'Amore-Bruno MA, Korfhagen TR, Glasser SW, Whitsett JA, et al. Chromosomal localization of three pulmonary surfactant protein genes in the mouse. *Genomics* 1992; 12(2): 388-393.
286. Selman N, King TE, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134(2): 136-51.
287. Wang Y, Voelker DR, Lugogo NL, Wang W, et al. Surfactant protein A is defective in abrogating inflammation in asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 301(4): L598-L606.
288. Tagaram HR, Wang W, Umstead TM, Mikerov AN, Thomas NJ, et al. Characterization of a human surfactant protein A1 gene-specific antibody; SP-A1 content variation among individuals of varying age and pulmonary health. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292(5): L1052-L1063.
289. Phelan SA. AOP2 (antioxidant protein 2): structure and function of a unique thiol-specific antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 1999; 1(4): 571-584.
290. Furnes B, Feng J, Sommer SS, Schlenk D. Identification of novel variants of the flavin-containing monooxygenase gene family in African Americans. *Drug Metabol Dispos* 2003; 31(2): 187-193.
291. Whetstone JR, Yuen MF, McCarver DG, Williams DE, et al. Ethnic differences in human flavin-containing monooxygenase 2 (FMO2) polymorphisms: detection of expressed protein in African-Americans. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 168(3): 216-224.
292. Charnay Y, Bouras C, Vallet PG, Golaz J, Guntern R, Constantinidis J. Immunohistochemical distribution of delta sleep inducing peptide in the rabbit brain and hypophysis. *Neuroendocrinology* 1989; 49(2): 169-175.
293. Westrin A, Ekman R, Träskman-Bendz L. High delta sleep-induced peptide-like immunoreactivity in plasma in suicidal patients with major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 1998; 43(10): 734-739.
294. Khvatova EM, Samartzev VN, Zagoskin PP, Prudchenko IA, Mikhaleva II. Delta sleep inducing peptide (DSIP): effect on respiration activity in rat brain mitochondria and stress protective potency under experimental hypoxia. *Peptides* 2003; 24(2): 307-311.

