



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Programa de Doctorado de BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN

TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD

Facultad de Medicina

Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

**Variación de la expresión génica producida
por el sevoflurano en los pacientes
intervenidos de bypass aortocoronario
sin circulación extracorpórea**

Juan José Escalona Belmonte

Marzo, 2021

Director:

José Luis Guerrero Orriach

Tutor:


Inmaculada Bellido Estevez





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Juan José Escalona Belmonte

 <https://orcid.org/0000-0002-2633-2260>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña JUAN JOSÉ ESCALONA BELMONTE

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA PRODUCIDA POR EL SEVOFLURANO EN LOS PACIENTES INTERVENIDOS DE BYPASS AORTOCORONARIO SIN CIRCULACIÓN EXTRACORPÓREA

Realizada bajo la tutorización de INMACULADA BELLIDO ESTEVEZ y dirección de JOSÉ LUIS GUERRERO ORRIACH (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 28 de ABRIL de 2021

 Fdo.: JUAN JOSÉ ESCALONA BELMONTE Doctorando/a	 BELLIDO ESTEVEZ M INMACULADA Firmado digitalmente por BELLIDO ESTEVEZ M INMACULADA - . . Fecha: 2021.04.28 20:19:21 +02'00' Fdo.: INMACULADA BELLIDO ESTEVEZ Tutor/a
 Fdo.: JOSÉ LUIS GUERRERO ORRIACH	

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



EFQM AENOR



Edificio Rebelión de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 81 / 952 13 71 10
E-mail: doctoredo@uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dr. José Luis Guerrero Orriach, Facultativo Especialista de Área de Anestesia, Reanimación y Medicina del Dolor, del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga.

Dra. Inmaculada Bellido Estevez, Profesora Titular de Farmacología, Departamento de Farmacología y Pediatría. Facultad de Medicina, Universidad de Málaga

CERTIFICAN Que D/D^a. **JUAN JOSÉ ESCALONA BELMONTE**

ha obtenido, estudiado y analizado personalmente bajo nuestra dirección y tutela los datos clínicos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: **“VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA PRODUCIDA POR EL SEVOFLURANO EN LOS PACIENTES INTERVENIDOS DE BAYPASS AORTOCORONARIO SIN CIRCULACIÓN EXTRACORPÓREA”**, que consideramos que está preparado para su lectura y defensa y que tiene el contenido y rigor científico necesarios para ser sometida a juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el presente certificado en

Málaga 31 de marzo de dos mil veintiuno.

Dr. José Luis Guerrero Orriach

Director de Tesis

Dra. Inmaculada Bellido Estevez

Tutor/a de Tesis

Dedicada a todos los que habéis creído esto posible.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, que han sido mi apoyo, mi referencia, mi base, mis raíces, mi refugio, mi felicidad; sobre todo a ti papá, ahora que tu silencio eterno me recuerda los silencios con que celebrabas mis alegrías.

A Caye, mi presente y mi futuro.

A Marta que me ha enseñado a ver lejos “subido en hombros de gigantes” y a Guerrero para el que no hay forma de expresar todo lo que le debo.

ÍNDICE

Resumen	3
1. Introducción	5
1.1. Definición de cardiopatía isquémica y su tratamiento quirúrgico.	5
1.2. Mecanismos de daño por isquemia reperfusión	6
1.3. Cirugía de bypass aortocoronario con y sin circulación extracorpórea	8
1.4. Anestesia en cirugía cardíaca	10
1.4.1. Propofol en anestesia cardíaca	10
1.4.2. Anestésicos inhalatorios en cirugía cardíaca: Sevoflurano	11
1.5. Sedación en críticos	12
1.6. Biomarcadores de función cardíaca	13
1.6.1. Biomarcadores de daño e isquemia miocárdica	13
1.6.2. Biomarcadores de disfunción del ventrículo izquierdo	14
1.7. Cardioprotección	14
1.8. Precondicionamiento y postcondicionamiento	15
1.8.1. Precondicionamiento	15
1.8.2. Acondicionamiento durante la isquemia	16
1.8.3. Postcondicionamiento	16
1.8.4. Mecanismos de precondicionamiento	17
1.8.5. Mecanismos de postcondicionamiento	19
1.8.5.1. Vía RISK	19
1.8.5.2. Vía SAFE	20
1.8.6. Estudios en clínica.	20
1.8.7. Enzimas relacionadas con el acondicionamiento	22
1.9. MicroRNA	23
1.9.1. MicroRNA y control genético postranscripcional	23
1.9.2. Determinación de microRNA	27
1.9.3. MicroRNA y anestesia	27
2. Hipótesis	28
3. Objetivos	28
4. Material y métodos	29
4.1. Diseño del estudio	29
4.2. Población de estudio	29
4.3. Protocolo de estudio. Recogida de datos. Plan de trabajo.	30
4.3.1. Protocolo de trabajo	30
4.3.2. Anestesia y procedimiento quirúrgico	31
4.3.3. Determinación de variables hemodinámicas.	32
4.3.4. Análisis bioquímico.	33
4.3.5. Enzimas involucradas en efectos beneficiosos	33
4.3.6. Metodología para la determinación de miRNAs	34
4.3.7. Acontecimientos adversos	35
4.3.8. Análisis estadístico	35
4.4. Anexos del material y métodos.	37
5. Resultados	54

6. Discusión	61
6.1. Limitaciones del estudio	67
6.2. Posibilidades de futuro	68
7. Conclusiones	68
8. Diccionario de siglas	69
9. Bibliografía	71
10. Publicaciones	90

Resumen

Los niveles de miRNAs en el suero de pacientes expuestos a sevoflurano en el intra y postoperatorio de cirugía de revascularización miocárdica sufren variaciones. Además, el efecto cardioprotector de esta exposición del sevoflurano está relacionada con las variaciones en los niveles de miRNAs cardioprotectores, que pueden coincidir con los evidenciados previamente en modelos animales, y validados in vitro (let7b, 139-5b, 487b, 125b). Nos basamos en estudios previos de este grupo de trabajo realizados en clínica donde observamos un beneficio en el uso de anestésicos halogenados planteándonos un estudio retrotraslacional.

Para poder estudiar la cardioprotección ofrecida por halogenados necesitamos generar períodos de isquemia controlados en los pacientes, de ahí la elección de la cirugía de revascularización miocárdica sin circulación extracorpórea, ya que estos episodios de isquemia forman parte del desarrollo habitual de esta técnica. Estos períodos, van a generar lesiones por isquemia reperfusión que nos permitirán estudiar las variaciones en los miRNAs de pacientes anestesiados con propofol versus sevoflurano.

Además, para potenciar los posibles resultados alargamos la sedación de nuestros hasta el período postoperatorio según su brazo de ensayo basándonos en conclusiones de estudios previos donde objetivamos que estas variaciones se relacionan con la dosis recibida del fármaco anestésico.

Así planteamos la hipótesis de que los niveles de miRNAs en el suero de pacientes expuestos a sevoflurano en el intra y postoperatorio sufren variaciones y que, el efecto cardioprotector asociado al sevoflurano en estudios previos, se debe a variaciones en miRNAs cardioprotectores.

Nuestros objetivos fueron: Analizar cuáles son los microRNAs (cardioprotectores) que varían cuando se administra sevoflurano en el intra y postoperatorio a pacientes de elevado riesgo de cardiopatía isquémica que se intervienen de cirugía coronaria, frente a aquellos que fueron anestesiados con propofol durante el mismo período. Utilizar una técnica cuantitativa para medir la variación de los miRNAs cardioprotectores en pacientes de elevado riesgo isquémico que se exponen al sevoflurano intra y postoperatorio como medida de pre y postcondicionamiento. Intentar correlacionar los niveles de expresión de varios microRNA en suero de pacientes de alto riesgo con la morbimortalidad de los mismos.

Material y métodos: Ensayo clínico fase IV controlado y aleatorizado en el que se asignaron cuatro pacientes a cada brazo de ensayo tras haber cumplido con los criterios de inclusión y haber firmado el consentimiento. Los brazos de ensayo fueron anestesia intraoperatoria y sedación postoperatoria con propofol versus anestesia intraoperatoria y sedación postoperatoria

con sevoflurano. Sobre las muestras de estos pacientes se realizó secuenciación NGS y posterior confirmación con RT-qPCR, el análisis bioinformático y los cálculos estadísticos que nos permitieron comparar ambos grupos.

Discusión: La cirugía de revascularización miocárdica presenta una elevada morbimortalidad, habiéndose definido estrategias terapéuticas capaces de reducirla, entre las que se encuentran los anestésicos halogenados. Diferentes trabajos previos muestran cómo estos fármacos halogenados son capaces de conferir protección al miocardio traducida en menos niveles de biomarcadores de daño y disfunción miocárdicos. En este trabajo hemos querido evaluar los mecanismos genéticos que subyacen a los procesos de acondicionamiento generados por estos anestésicos y hemos hallado a través de la secuenciación completa de ambos grupos determinados miRNAs con efectos cardioprotectores relacionados con el uso de sevoflurano en comparación con el uso de propofol. Además, estos miRNAs se han mostrado diferentes a los del acondicionamiento isquémico. Los hallazgos de este trabajo muestran cómo los cambios en los patrones de miRNAs de ambos fármacos asociaron un mejor pronóstico en pacientes con cardiopatía isquémica. Por últimos destacar cómo el efecto que tiene cada fármaco sobre la expresión del miRNA 197-3p es contrario y el efecto obtenido finalmente es una regulación al alza o a la baja de enzimas fuertemente relacionadas con el acondicionamiento.

Considero como conclusiones principales que la secuenciación nos ha permitido detectar una variación en la expresión de miRNAs relacionada con el acondicionamiento farmacológico con halogenados, diferente de las publicadas en otros trabajos relacionados con el pre y postcondicionamiento isquémico, por lo que destacamos la utilidad de la secuenciación NGS frente al uso de arrays con patrones de miRNAs ya conocidos. El empleo de propofol como hipnótico de forma continuada durante el intra y el postoperatorio de estos pacientes determina un cambio en la expresión génica de miRNAs que conllevan una disminución en la expresión de enzimas relacionadas con el pre y postcondicionamiento como las del grupo STAT o la enzima MAPK. El uso de sevoflurano como hipnótico de manera continuada tanto durante el intraoperatorio como en el postoperatorio de estos pacientes, conlleva un cambio en la expresión génica relacionado con los miRNAs que consigue la activación de enzimas mediadoras del pre y postcondicionamiento anestésico como AKT, ERK, vías PI3K/Akt y enzimas del grupo STAT, destacando el papel del miRNA 197-3p.

1. Introducción

El conocimiento de los fármacos anestésicos hipnóticos habitualmente empleados es cada vez mayor, de manera que en los últimos 30 años, hemos obtenido datos acerca de las posibilidades terapéuticas de los mismos. Así, surge la organoprotección como la posibilidad de emplear estos fármacos en el perioperatorio con fines terapéuticos.

Esta organoprotección ha sido ampliamente estudiada en la cirugía cardíaca ya que las condiciones de accesibilidad en cuanto a monitorización hemodinámica y marcadores analíticos de daño miocárdico han sido favorables. Este tipo de cirugía además, nos da la posibilidad de reproducir cortos períodos de isquemia como parte del procedimiento, permitiendo traducir las observaciones experimentales y obtener la secuencia de preconditionamiento, isquemia y reperfusión. (De Hert SG, 2008).

Tras el uso extendido de anestesia total intravenosa con dosis elevadas de opiáceos en cirugía cardíaca aduciendo gran estabilidad hemodinámica, el uso de los anestésicos inhalatorios se introdujo con fuerza en cirugía cardíaca desde la aparición del halotano y sus condiciones de seguridad. (Warltier DC, 1988).

Recientemente, han sido numerosos los trabajos que se han publicado en torno a los efectos protectores de los anestésicos inhalatorios, medidos en datos clínicos o analíticos y expresados incluso en variaciones en las concentraciones plasmáticas de determinadas proteínas, sin embargo, pocos han sido los estudios que han tratado de dilucidar los mecanismos genéticos que subyacen en estos beneficios desde un enfoque retro-traslacional.

1.1. Definición de cardiopatía isquémica y su tratamiento quirúrgico.

La base de la cardiopatía isquémica es un desbalance entre el aporte y la demanda de oxígeno del miocardio y su etiología más frecuente es la enfermedad aterosclerótica. Cabe destacar el importante impacto social y económico de esta enfermedad ya que constituye la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo desarrollado. (Bosnjak ZJ, 2007) (De Hert SG, 2008) (Hausenloy DJ, 2012).

La cirugía de revascularización miocárdica constituye el tratamiento de elección de esta patología en un alto número de pacientes con impacto pronóstico y en calidad de vida. La realización del baipás aortocoronario se asocia a una morbimortalidad cada vez menos gracias al desarrollo de la técnica quirúrgica sumado a los progresos de la técnica anestésica. (Melero JM, 2006) (Hausenloy DJ, 2012).

1.2. Mecanismos de daño por isquemia reperusión

La interrupción del aporte energético durante la isquemia cardíaca eleva la concentración intracelular de lactato y otros metabolitos con disminución del pH y depleción rápida de las reservas de adenosina trifosfato celular (ATP). (Reimer KA et al, 1981)

La mitocondria tiene altos requerimiento de oxígeno durante la isquemia que conlleva elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); además, la mitocondria en condiciones normales regula la concentración celular de iones, fundamental para evitar los procesos de daño celular, inducidos principalmente por el aumento de la concentración de Ca^{2+} . La caída de los depósitos de ATP produce graves alteraciones iónicas en la célula. Esta disminución del ATP hace fallar la bomba sodio/potasio (Na^+/K^+) que conlleva una elevación mantenida de la concentración intracelular de sodio (Na^+), lo que a su vez activará el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana celular en su modo reverso que, aunque consigue disminuir la concentración de Na^+ intracelular, eleva la de iones calcio (Ca^{2+}). El incremento del Ca^{2+} , es uno de los desencadenantes del daño celular, a través de la alteración de la estructura de la membrana, que culmina en la muerte celular. (Perrelli MG et al, 2011)

Al daño celular que tiene lugar en la reperusión contribuyen la sobrecarga de Ca^{2+} , la síntesis inadecuada de ATP, la baja producción de óxido nítrico (NO) y el estrés oxidativo por ROS que terminan produciendo daño celular. (Crompton M, 1999) (Ladilov Y et al, 2003) (Kutala VK et al, 2007) (Piper HM et al, 2004)

Con el reinicio del flujo se eleva la concentración de ATP que tiene relación con el daño celular a través de la hipercontractura de los miocardiocitos, la disrupción de su membrana y por último la muerte celular (“necrosis en banda”). (Piper HM et al, 2006) (Piper HM et al, 2004)

Unido a esto, existe un intento celular de mantener la homeostasis interna a través de la eliminación de los hidrogeniones (H^+) acumulados en su interior mediante un mecanismo intercambiador Na^+/H^+ en la membrana plasmática, que a su vez activa el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$; ambos terminan aumentando el Na^+ intracelular que, de nuevo, es controlado a través del intercambio con el medio externo de Na^+ por Ca^{2+} . La síntesis mitocondrial de ATP es reactivada y pone en marcha la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico de la célula que provoca la entrada de Ca^{2+} hasta saturarlo. La elevación masiva del Ca^{2+} alcanza un punto en que se ve obligada a expulsarlo de vuelta al citosol a través de los receptores de rianodina colaborando de manera importante con el daño y apoptosis celular. (Abdallah Y et al, 2005) (Inserte J et al, 2002)

Por último, los movimientos iónicos producen edematización y desestructuración de las organelas y el citoesqueleto celular, a través del gradiente osmótico creado. (Ruiz-Meana M et al, 1995) (García-Dorado D et al, 1992) (Ruiz-Meana M et al, 1995).

La pérdida de la integridad mitocondrial debido a un cambio brusco en la permeabilidad de su membrana es otro de los mecanismos de gran importancia que explican el daño celular. La principal etiología que produce esta disfunción mitocondrial incluye la recuperación del pH, el estrés oxidativo y la sobrecarga de Ca^{2+} , que inducen la apertura abrupta de los poros de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP), relacionados con la conductancia en la membrana mitocondrial interna (IMM). El pH <7.4 disminuye la permeabilidad de la membrana y descende los niveles de Ca^{2+} intracelular, sin embargo, valores de pH >7.4, unido a concentraciones elevadas de fósforo inorgánico (PI) intracelular, de ROS y bajos niveles de NO, producen el efecto contrario. Según el tiempo que permanezca abierto el mPTP, se producirán mecanismos de cardioprotección inducidos (corta duración) o la entrada de iones y solutos con elevado peso molecular (1.5 kDa), tumefacción de la matriz y pérdidas de gradientes electroquímicos celulares críticos, con la hidrólisis del ATP celular por la ATPasa y la apoptosis celular (larga duración). (Duchen MR, 2000) (Petronilli V et al, 2001) (Baines CP et al, 2003) (Halestrap AP and Brennerb C, 2003) (Ruiz-Meana M et al, 2007) (Di Lisa et al, 2011) (Lemasters JJ et al, 1996) (Halestrap AP and Pasdois P, 2009)

La unión de los mecanismos principales, disfunción de la mPTP y aumento de los niveles de calcio intracelular, producen la activación de la fosfolipasa A2 y la calpaína (proteasas que necesitan la interacción del calcio para su activación, inhibidas durante la acidosis). En la fase de reperfusión con la recuperación brusca del pH y el aumento de Ca^{2+} , junto con los efectos de la calpaína, agravan la destrucción de la célula y de nuevo alteran la función de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, repitiéndose el ciclo que conlleva a elevación intracelular deletérea de Na^+ y Ca^{2+} . (Inserte J et al, 2005) (Shulga N et al, 2006) (Penzo D et al, 2004) (Inserte J et al, 2011)

El daño mitocondrial con la liberación de la proteína Bcl-2, el efecto de la L-selectina plaquetaria, la disfunción de la homeostasis del Ca^{2+} , los neutrófilos y los fibroblastos, pueden contribuir al daño por reperfusión y a la extensión final de la muerte celular. Otro grupo enzimático, denominado genéricamente proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), tienen un papel determinante en los procesos de señalización intracelular en los procesos inflamatorios y en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis. Además regulan la activación de las caspasas, principalmente la 3, la 6 y la 9, que terminan produciendo la muerte celular. (Kinnally KW et al, 2007) (Green DR and Kroemer H, 2004) (Mirabet M et al, 2005) (Barrabés JA et al, 2007)

Este mecanismo fisiopatológico se puede extender a las células vecinas a través de las *gap junctions*, lo que provoca un aumento de la extensión de la apoptosis celular. (Rawanduzy A et al, 1998) (Ruiz-Meana M et al, 1999) (Rodríguez-Sinovas A et al, 2004) (Lin JH et al, 1998)

1.3. Cirugía de baipás aortocoronario con y sin circulación extracorpórea.

La cirugía de baipás aortocoronario es una de las técnicas que mayor avance ha presentado en los últimos tiempos y, generalmente, se ha asociado al uso de circulación extracorpórea (CEC), ya que es una manera de conseguir mejores condiciones quirúrgicas y de proteger el miocardio expuesto a la isquemia. A pesar de estas ventajas, el uso de CEC asocia diversas alteraciones fisiopatológicas que conlleva riesgos a diferentes niveles. A nivel hematológico, se desencadena la coagulación y la fibrinólisis, con mayor agregabilidad de hematíes que repercute en la microcirculación y predispone a la hemólisis. Otra de las características destacables de la CEC, es que proporciona al organismo un flujo no pulsátil que provoca liberación de vasoconstrictores, enzimas proinflamatorias y radicales libres con la lesión subyacente. Además, hay órganos que quedan excluidos de la perfusión, originando una lesión por isquemia reperusión. (Stammers AH, 1997) (Ramírez A et al, 2017).

Debido a todos estos efectos deletéreos derivados del uso de la CEC, se ha intentado desarrollar técnicas quirúrgicas capaces de disminuir su uso y con ello el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) que asocia.

Muchos son los estudios que han tratado de dilucidar si la alguna de las dos técnicas es superior a la otra, ya que existen grupos que han optado por la cirugía sin CEC, intentando evitar los efectos perjudiciales asociados a la misma. Estos grupos han estudiado el grado de revascularización completa y permeabilidad de los bypass y los efectos adversos graves, con resultados similares. Según ha publicado la Sociedad Americana del Corazón, son factores como la habilidad del cirujano más que el uso o no de CEC, los que determinan el pronóstico de estos pacientes (Selke FW et al, 2005).

Grandes estudios randomizados como *CORONARY* o *GOPCABE* recogidos en diferentes publicaciones no encuentran diferencias significativas entre ambas técnicas evaluando efectos adversos a los 30 días y al año. Cabe destacar que en estos estudios se requirió mayor experiencia en las cirugías realizadas sin CEC. Estas publicaciones arrojan datos que indican que los casos con factores agravantes como cirugías urgentes, o en pacientes de elevado riesgo por enfermedades concomitantes como enfermedad obstructiva crónica (EPOC) o con mala función ventricular, son los que mayor se benefician de las técnicas sin CEC. (Lamy A et al. 2013) (Hattler B et al. 2012) (Diegeler A et al 2013).

Son varios los trabajos publicados en los que, a pesar de que no hay cambios en la mortalidad de pacientes intervenidos con CEC frente a aquellos sin CEC, sí indican menor morbilidad en el postoperatorio temprano, como menor incidencias de fenómenos embólicos, de uso de hemoderivados, desarrollo de SIRS, disfunción cognitiva, disfunción multiorgánica, así como una mejor conservación de la microcirculación, menor estancia en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y menor uso de recursos. (Sun JH et al, 2012) (Garg AX, 2014) (Hemmerling TM et al, 2013) (Afilalo J et al, 2012) (Koning J et al.2014).

El uso de la cirugía sin CEC, se ha extendido con la aparición de grupos que la aplican de manera protocolizada como en nuestro centro, donde ha experimentado una clara progresión en los últimos tiempos. Esta evolución queda recogida en la siguiente figura. (Melero JM, 2006).

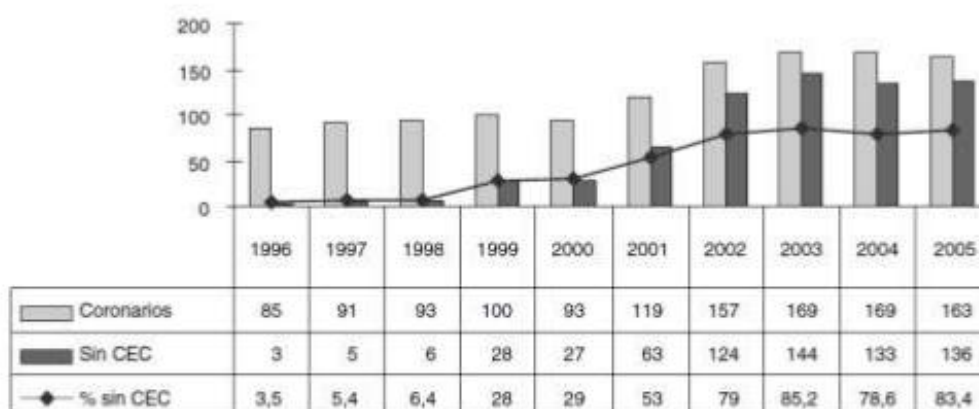


Figura 1. Evolución de la cirugía coronaria sin CEC/años en el Hospital Virgen de la Victoria. Tomado de: José María Melero Tejedor. Cir Cardiov. 2006; 13 (4): 263-71 ¿Cirugía sin bomba para todos?

La isquemia es inherente a este tipo de cirugía ya que precisa el clampaje de las arterias coronarias para proporcionar un campo libre de sangre para la realización de la anastomosis coronaria. El grado de severidad de la isquemia dependerá del grado de estenosis del vaso y de la presencia o no de colaterales y se puede paliar mediante el manejo hemodinámico intensivo del paciente.

En el desarrollo de esta técnica quirúrgica es necesario el uso de instrumentos que exponen el campo quirúrgico pero que a la vez dejan movimiento al miocardio, así como instrumentos que realizan protección miocárdica. Dentro de los primeros encontramos fundamentalmente, los

posicionadores de ventosa y los estabilizadores y dentro de los segundos, el uso de shunt. (Chassot PG et al, 2004).

1.4. Anestesia en cirugía cardíaca

Kissin define en 1993 la anestesia del paciente como un estado de amnesia, inconsciencia, analgesia, ansiolisis y supresión de respuestas motoras, cardiovasculares y hormonales. (Kissin I, 1993).

Son varios los factores implicados en la elección del tipo de anestésico a utilizar en un paciente como las patologías previas del paciente o la evolución prevista de la cirugía y el postoperatorio. Además, a lo largo de la historia se ha evolucionado de elección de fármacos basada en la estabilidad hemodinámica proporcionado de los mismos, a una elección que también valora la evolución postoperatoria en términos de resultados como necesidad de ventilación mecánica o búsqueda de efectos organoprotectores (Fanjca F et al, 2009). (Hemmerling TM et al, 2013).

Así, en la actualidad los hipnóticos habituales para el mantenimiento anestésico en cirugía cardíaca son el propofol y los anestésicos halogenados.

1.4.1. Propofol en anestesia cardíaca.

El 2,6-di-isopropilfenol o propofol es uno de los hipnóticos más usados tanto en la inducción como en el mantenimiento de la cirugía cardíaca y no cardíaca y en el postoperatorio. Actúa facilitando la neurotransmisión inhibitoria del ácido γ aminobutírico (GABA) a través de los receptores GABA A. (Trapani G et al, 2000).

El uso de propofol a dosis de inducción (2mg/kg) se asocia a una caída en el gasto cardíaco, las RVS, el volumen latido y el índice de trabajo sistólico ventricular izquierdo, lo que se traduce en una reducción de la presión arterial que alcanza hasta una 15-40% de la sistólica (PAS) y valores similares en la presión arterial media (PAM) y diastólica (PAD) fundamentalmente en la inducción ya que, en el mantenimiento, con dosis menores, no se presentan con tanta intensidad. (Miller RD et al, 2010).

Son varios los efectos beneficiosos atribuidos al propofol en diferentes estudios, fundamentalmente, efectos antioxidantes y barredor de radicales libres con resultado cardioprotector, y estabilidad hemodinámica con disminución de respuesta de estrés. Un estudio llevado a cabo por Corcoran y cols en 2004 observó que el propofol atenuaba el daño

miocárdico por reperfusión mediado por radicales libres en pacientes con fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) conservada que se intervinieron de baipás aortocoronario, gracias al bloqueo de la entrada de calcio y de la actividad inmunológica con caída de interleuquinas inflamatorias como la IL-6 y -10 (Krzych LJ et al, 2009) (Corcoran et al, 2004) (Ruggeri L et al, 2011).

A pesar de los datos anteriores, los estudios en clínica arrojan resultados contradictorios en cuanto a la protección del propofol frente a la lesión por isquemia-reperfusión. Xia estudió este efecto protector sobre 54 pacientes a los que administró dosis altas de propofol (120mcg/kg/min), dosis bajas de propofol (60mcg/kg/min) o isoflurano durante la CEC y encontró menores niveles de troponina I, mejor índice cardíaco (IC) y menores requerimientos de inotrópicos en el primer grupo (Xia Z, et al, 2006). En consonancia con el estudio de este grupo, los efectos cardioprotectores que se han objetivado con este fármaco, se relacionan con dosis más altas que las habituales de la práctica clínica. (Kokita N et al, 1998).

1.4.2. Anestésicos inhalatorios en cirugía cardíaca: Sevoflurano

La evidencia científica que avala el efecto cardioprotector del sevoflurano es creciente. Debido a que las complicaciones cardiovasculares derivadas de la respuesta inflamatoria secundaria a la isquemia son una constante en pacientes sometidos tanto a cirugía cardíaca como no cardíaca, cualquier medida que puede ayudar a disminuirlas debe ser parte del arsenal terapéutico usado perioperatoriamente, especialmente en aquellos que presentan más riesgo de sufrir isquemia. Los anestésicos volátiles disminuyen la función cardíaca y, con ello, consiguen disminuir la demanda de oxígeno por parte del miocardio con lo que podrían tener un papel beneficioso durante el eventual episodio isquémico. (Butterworth J et al, 2014).

El Sevoflurano es un derivado fluorado del metil-isopropil-éter que tiene diferentes efectos hemodinámicos muy interesantes en cirugía cardíaca. Administrado a 1.2 CAM (concentración alveolar mínima) es capaz de disminuir la PAM hasta un 30% a expensas de reducir el gasto cardíaco sin afectar a la frecuencia o a la resistencia vascular sistémica (RVS), es decir, debido a un descenso del inotropismo a través de mecanismos vegetativos. Este efecto inotropeo negativo es común a otros inhalatorios y es dosis dependiente. Cabe destacar que el sevoflurano es el menor inotropeo negativo de todos los anestésicos inhalatorios. (Miller et al, 2010)

Son varios los estudios que han tratado de comparar el efecto cardioprotector de los anestésicos volátiles con respecto al propofol en pacientes sometidos a cirugía cardíaca, observándose menores concentraciones plasmáticas de troponina I postoperatoria y mejores IC en aquellos pacientes que recibían sevoflurano. Guarracino y cols. publicaron un resultado similar comparando el uso de desflurano con el de propofol en pacientes intervenidos de cirugía de

revascularización sin CEC. (Cozen PF et al, 2003) (Guarracino F et al, 2006) (Tritapepe L et al, 2007).

Los resultados de estos estudios comienzan a plantear la posibilidad de que la elección del régimen anestésico pueda tener un efecto en el resultado de los pacientes sometidos a cirugía cardíaca. Esto se confirmó con un metaanálisis de Landoni y cols. del año 2007 donde se estudiaron 1922 pacientes sometidos a cirugía cardíaca comparando el uso de anestésicos volátiles (sevoflurano y desflurano) con el uso de anestesia total intravenosa (propofol y remifentanilo) y, que tuvo como resultado, una reducción significativa de la morbilidad, con menor tasa de infarto de miocardio y menor mortalidad, en el primer grupo. Todos menos uno de los 22 estudios controlados incluidos en este metaanálisis, un grupo de pacientes de bajo riesgo, favorecieron los inhalatorios. (Landoni G et al, 2007). En 2013, este mismo grupo de trabajo publica una reducción de la mortalidad en pacientes anestesiados con desflurano o sevoflurano que se someten a cirugía de derivación coronaria comparados con pacientes anestesiados con TIVA (anestesia total intravenosa). (Landoni G et al 2013).

1.5. Sedación en críticos

Los pacientes ingresados en UCI postquirúrgicos precisan sedación y analgesia ya que es frecuente en ellos la aparición de dolor y ansiedad, que se pueden acompañar de una respuesta neuroendocrina de estrés que podría derivar en complicaciones como la aparición de eventos isquémicos. Además, otro de los objetivos de la sedación en críticos es la adaptación del paciente a la ventilación mecánica. Así, es un tema de vital importancia, especialmente en estos pacientes con riesgo alto de morbimortalidad. Esta sedación se alarga en el tiempo hasta conseguir una adecuada hemodinámica y temperatura del paciente que permita la retirada de la ventilación mecánica en el contexto de seguridad necesario. (Mendel PR et al, 1993).

El sedante ideal debería caracterizarse por el inicio inmediato de su acción, el ajuste fácil de las dosis, la recuperación rápida, amplio margen terapéutico, ausencia de acumulación y de interacciones farmacológicas y de efectos secundarios, además de bajo coste. Sin embargo, actualmente no disponemos ningún fármaco que reúna todas las características mencionadas ni que muestre una superioridad clara en la práctica clínica. Los sedantes de uso más extendido son aquellos indicados en las Sociedades Científicas y guías clínicas. (Izurieta R et al, 2002) (Jacobi J et al, 2002) (Kong DL et al, 2003). De administración intravenosa, los más habituales son el propofol y el midazolam, usando el primero para aquellos pacientes en los que se prevé un breve período de sedación y el segundo para aquellas sedaciones prolongadas. El grupo de Trabajo de Sedación y Analgesia de la SEMICYUC estableció, por consenso, definir la sedación prolongada como aquella cuya duración supera las 72 horas (medicina intensiva).

Además, disponemos de sedación mediante anestésicos inhalatorios, fundamentalmente, sevoflurano a través del dispositivo de conservación de gases anestésicos (*Anaesthetic Conserving Device, AnaConDa*[®]). Este dispositivo ha mostrado en diversas publicaciones un adecuado nivel de seguridad, reproductibilidad y capacidad para prever el efecto de la sedación en UCI. (Nickel EA et al, 2007) (Peyró R et al, 2010) (Meiser A, Laubenthal H, 2005). Por otra parte, este dispositivo puede ser empleado en cualquier respirador de críticos con una eficacia comparable a la de los vaporizadores convencionales. (Soro M et al, 2010)

Sumado al efecto hipnótico del sevoflurano y a su posible efecto cardioprotector, este fármaco presenta actividades que le confieren otras utilidades en UCI como su efecto broncodilatador en el tratamiento de broncoespasmos refractarios y su efecto anticonvulsivante para el tratamiento de estatus epilépticos. Todo esto, lo recomienda como alternativo a la sedación habitual. (Guerrero JL et al, 2011) (Schultz TE, 2005).

Meiser y cols. publican el primer estudio en el que se compara la sedación con sevoflurano frente a propofol en pacientes sometidos a cirugía coronaria con CEC randomizados sin tener en cuenta la técnica anestésica intraoperatoria y no encuentran diferencias significativas en enzimas, morbimortalidad o días de estancia en UCI. (Meiser A, Laubenthal H, 2005).

Posteriormente, varias publicaciones han reflejado el beneficio de este fármacos en la protección frente al daño miocárdico por isquemia reperfusión en cirugía cardíaca y no cardíaca así como el efecto organoprotector en riñón, sistema nervioso, hígado o endotelio. (Landoni G et al, 2009) (Julier K et al, 2003) (Beck-Schimmer B et al, 2008).

1.6. Biomarcadores de función cardíaca.

Estos marcadores nos indican determinadas situaciones en el perioperatorio de cirugía cardíaca y así, los dividimos en función de que señalen daño e isquemia, inflamación o fallo del ventrículo izquierdo. (Lundblad RL, 2011).

1.6.1. Biomarcadores de daño e isquemia miocárdica.

El uso de estos biomarcadores es práctica clínica habitual en la cirugía coronaria e incluyen habitualmente las troponinas T e I y la fracción sérica de la creatín fosfoquinasa (CPK-MB). De estos, la troponina es el que adquiere mayor relevancia para la detección de isquemia ya que presenta elevada especificidad y sensibilidad, llegando a detectar niveles mínimos de daño miocárdico. Además, son marcadores precoces, por lo que permiten detectar isquemia de manera temprana y tienen significado pronóstico en la evolución y los resultados de los pacientes (Bignami et al, 2009).

Las troponinas son complejos proteicos presentes en el músculo cardíaco y regulan la contracción. Están formadas por tres subunidades, la C (TnC), la I (TnI) y la T (TnT). La primera liga el calcio, la segunda regula la interacción entre la actina y la miosina y la última se une a la tropomiosina. Mediante técnicas de inmunoanálisis tenemos la capacidad de detectar la TnI y la TnT evitando la reactividad cruzada de otras formas de las mismas presentes en el músculo esquelético, de manera que conseguimos adecuados niveles de sensibilidad y especificidad en la detección de la isquemia coronaria aguda. (Bucher EA et al, 1988). De estas troponinas, las publicaciones reflejan la TnI como la más sensible y eficiente en la detección de isquemia, por encima de la TnT siendo, por tanto, la de elección para el diagnóstico de eventos isquémicos. (Poldermans D et al, 2009)

Estas troponinas no sólo detectan isquemia en el perioperatorio, sino que sus niveles se elevan debido a causas como el clamp aórtico, la pericardiotomía y la manipulación cardíaca incluyendo estabilizadores y succionadores. (Brown JR et al, 2007) (Bonney E et al, 1998)

1.6.2. Biomarcadores de disfunción del ventrículo izquierdo

Los miocitos ante un aumento de estrés en su pared responden mediante la secreción de péptido natriurético cerebral (BNP) y de la fracción aminoterminal de su propéptido (NT-proBNP) que es inactivo y tiene una vida media de 120 minutos. Usamos este propéptido como marcador en caso de disfunción cardíaca independientemente de la etiología de la misma. Tanto la cifra de BNP como de NT- proBNP tienen valor pronóstico para mortalidad y complicaciones cardíacas de la cirugía, con especial importancia como indicador de la gravedad y posible resolución de eventos coronarios isquémicos. Tiene capacidad pronóstica sobre la mortalidad en pacientes que ingresan en insuficiencia cardíaca y disfunción de ventrículo izquierdo. (Lundblad RL, 2011)

El NT-proBNP aparece en numerosas publicaciones como marcador de disfunción ventricular tanto sistólica como diastólica, como factor predictor de complicaciones pero también como factor estratificador del riesgo perioperatorio en pacientes intervenidos de cirugía cardíaca. En esta línea varias publicaciones relacionan niveles mayores de este marcador con mayor mortalidad. (Ryding AD et al, 2009) (Guerin V et al, 2006) (Cuthbertson et al, 2009) (Eliadsdottir SB, 2008).

1.7. Cardioprotección

La cardioprotección se define como la “preservación del corazón por reducción o prevención del daño miocárdico”, de esta manera, los instrumentos o mecanismos que consigan esta reducción del daño se definen como “cardioprotectores”. Se han definido multitud de mecanismos cardioprotectores como el uso de beta bloqueantes, de bloqueantes de los canales del calcio, soluciones cardiopléjicas o hipotermia o el preconditionamiento isquémico. El tema

que se desarrollará también se engloba dentro de las estrategias cardioprotectoras y se conoce como pre y postcondicionamiento farmacológico a través de fármacos hipnóticos inhalatorios. (Kubler W et al, 1996) (Balakumar P et al, 2008)

Son varias las publicaciones en la literatura que reflejan menor daño miocárdico tras una lesión por isquemia reperusión tras el uso de anestésicos volátiles, fundamentalmente estudiado por una menor elevación de marcadores de daño miocárdico y por mejor función cardíaca. Además, estas publicaciones van más lejos reflejando no sólo menores niveles de troponina I frente a aquellos pacientes anestesiados con TIVA, sino mejor resultado quirúrgico, con menor estancia en UCI e incluso disminución de la morbimortalidad. Además de esta troponina, otros marcadores de daño han disminuido, incluyendo el péptido natriurético total y cerebral, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) o la CK-MMB (De Hert SG et al, 2002) (El Azab SR et al, 2003) (Julier K, 2003) (De Hert SG et al, 2003) (De Hert SG et al, 2004) (Guarracino F et al, 2006). (Landoni G et al, 2007) (Landoni G et al, 2008)

Cabe destacar, que no todas las publicaciones apoyan estos resultados. Landoni y cols. No observan estos efectos beneficiosos en pacientes sometidos a cirugías de alto riesgo en un estudio multicéntrico que trató de demostrar cambios en el tiempo de estancia en UCI y disminución de la mortalidad a los 30 días y al año. (Landoni et al, 2014).

1.8. Precondicionamiento y postcondicionamiento

Las medidas cardioprotectoras se pueden llevar a cabo en tres momentos durante el insulto isquémico. Antes de que ocurra la lesión y hablaríamos de precondicionamiento, durante la isquemia y tras este período, que es lo que conocemos como postcondicionamiento. (Ovize M et al, 2010) (De Hert SG, 2004).

1.8.1. Precondicionamiento

El tejido miocárdico es extremadamente sensible a la isquemia, de manera que episodios prolongados conducen a la muerte celular. Sin embargo, períodos cortos de isquemia pueden reducir la gravedad de la lesión cardíaca. El concepto de precondicionamiento isquémico surge al observar el fenómeno mediante el cual períodos cortos de isquemia de baja magnitud producen cambios endógenos en el miocardio que lo protegen de episodios de isquemia mantenida que, en otras condiciones, podrían llegar a ser fatales.

Murry y cols. demostraron en 1986 en el corazón del perro que cuatro episodios de isquemia seguidos de cinco minutos, en lugar de empeorar la lesión, originaban protección frente a otras lesiones isquémicas subsiguientes, ya que estos tejidos que habían sufrido precondicionamiento isquémico, presentaban ciertos cambios metabólicos y genéticos que daban lugar a un menor

consumo de oxígeno y mejor homeostasis. Estos cambios que protegen de los daños por isquemia del tejido, se extienden al período de reperfusión, atenuando el daño en forma de menor producción de radicales libres, menor respuesta inflamatoria, menor apoptosis y mejoría de la microcirculación. (Murry CE et al, 1986) (Swyers T et al, 2014) (Balakumar P et al, 2008)

El preconditionamiento isquémico se divide en una fase temprana y otra tardía. La primera fase es de inicio rápido y de gran potencia, pero con una duración limitada a una o dos horas. La segunda fase tiene menor potencia y un inicio más lento, empezando a las 24 horas después del estímulo inicial pero, en cambio, se mantiene en el tiempo hasta 72 horas. (Landoni G et al, 2009) (Weinbrenner C et al, 2002)

Los efectos beneficiosos del preconditionamiento isquémico nos obligan a buscar alternativas con el fin de conseguirlos sin los riesgos derivados de la isquemia, sin embargo, las estrategias estudiadas entre las que encontramos los activadores de la protein-quinasa, los opiáceos, la noradrenalina, la acetilcolina, el alcohol etílico, los agonistas de los receptores de adenosina o la angiotensina II, no se usan en la práctica clínica por falta de eficacia o por sus efectos secundarios graves. En cambio, los agentes anestésicos volátiles, podrían conferir una protección miocárdica similar a la del preconditionamiento isquémico, pero evitando el riesgo de la isquemia deliberada sobre el miocardio, surgiendo así el interés por el acondicionamiento farmacológico. (Balakumar P et al, 2008).

A pesar de que decimos que estos fármacos emulan el preconditionamiento isquémico, sus efectos se describieron previamente al acuñamiento de este término ya que, Bland y Lowenstein en 1976 ya describieron cómo al clampar durante un breve periodo de tiempo una arteria coronaria en perros, el halotano era capaz de minimizar los cambios electrocardiográficos del segmento ST. En esta línea de trabajo, Warltier y cols. demostraron que (Bland JH et al, 1976) que el uso de halotano o isoflurano previo al episodio isquémico mejoraba la función sistólica del ventrículo al igual que, Casan y cols usando el isoflurano de la misma manera describieron el desencadenamiento de cardioprotección. Los trabajos que han seguido en esta línea relacionan estos efectos con la dosis, de manera que, a mayor concentración o duración de la exposición al halogenado, el efecto será mayor, perdurando incluso después de la metabolización del fármaco. (Cason BA et al, 1997) (Riess ML et al, 2004) (Landoni G et al, 2009) (Warltier DC et al, 1988).

1.8.2. Acondicionamiento durante la isquemia

En esta fase el objetivo prioritario será limitar las consecuencias de la isquemia-reperfusión y el avance de la lesión. Desde el punto de vista anestésico, pocos agentes han destacado por su acción protectora directa cuando se administran durante la isquemia.

1.8.3. Postcondicionamiento

Zhao describe el postcondicionamiento como un proceso por el que pequeños periodos de isquemia-reperusión tras la cirugía de revascularización coronaria, tiene un efecto cardioprotector. Este postcondicionamiento imita lo que ocurre en el preconditionamiento y consigue menor apoptosis y tamaño de la zona isquémica así como menor respuesta inflamatoria y, al igual que el preconditionamiento, puede obtenerse a través del empleo de fármacos como los anestésicos volátiles. Aunque es el grupo de Zhao el que habla por primera vez de los efectos cardioprotectores tras el episodio isquémico, es el grupo de Na el que usa por primera vez el término postcondicionamiento entendido como prevención y disminución de arritmias postoperatorias. Finalmente, empleamos este término cuando intentamos paliar los efectos deletéreos que tiene la restauración del flujo coronario tras un período de isquemia. (Na HS et al, 1996) (Zhao ZQ et al, 2003) (Zhao ZQ et al, 2006) (Kin H et al, 2004)

1.8.4. Mecanismos de preconditionamiento.

Parece que los desencadenantes del postcondicionamiento y el preconditionamiento podrían tener bastantes vías en común, siendo en ambos la protección de la mitocondria, la disminución de los mediadores inflamatorios y la prevención del acúmulo de Ca^{2+} intracelular los objetivos finales. (Halkos ME et al, 2004)

Los mecanismos celulares y moleculares implicados en el preconditionamiento anestésico del corazón han sido el centro de múltiples trabajos desde hace más de quince años hasta la actualidad. Existen múltiples estudios que intentan describir los mecanismos efectores de la cardioprotección con halogenados, identificando las rutas y enzimas implicadas en ella. (Zaugg M et al, 2003) (Zaugg M et al, 2003) (De Hert et al, 2005)

En general, tanto el preconditionamiento isquémico como el anestésico en el corazón presentan mecanismos de acción celular con vías comunes. Sin embargo, los perfiles de expresión génica en el preconditionamiento anestésico tienen diferencias con respecto al isquémico. (Sergeev O et al, 2004)

El preconditionamiento anestésico precoz, se basa en el efecto farmacológico de los halogenados en los canales de K^+ dependientes de ATP (KATP), preservando la proteína-quinasa C (PKC) y los receptores de adenosina, de igual manera que el preconditionamiento isquémico. El preconditionamiento tardío o “segunda ventana” está relacionado con la síntesis de proteínas mediadoras de la protección cardiaca, y se prolonga entre 24 y 72 horas después de su administración. En 2013 Quiao describió en corazones de rata los mecanismos fundamentales del preconditionamiento anestésico tardío que incluyen la activación del factor de transcripción nuclear B (NF-KB), la regulación de la autofagia y la atenuación de la expresión del factor de

necrosis tumoral (TNF-alfa), de la interleuquina-1 beta (IL-1 β) y de la caspasa-3. (Tonkovic-Capin M et al, 2002) (Pagel PS et al, 2011) (Quiao S et al, 2013)

Según Zaugg cuando se produce un estímulo capaz de desencadenar el mecanismo celular del preconditionamiento, se activan todos los mediadores desde el receptor de la membrana (lugar inicial de la acción) hasta el efector final. (Zaugg M et al, 2003) (Zaugg M et al, 2003)

La óxido nítrico sintasa (NOS) desencadena la liberación y formación de NO a través de un estímulo preconditionante. Este aumento en la producción de NO y la activación de PKC en el miocardio durante los periodos de isquemia y reperfusión breves se asocian con los efectos cardioprotectores.

Tanto en el preconditionamiento anestésico precoz como en el tardío, se requiere la participación de varios receptores de superficie de la fibra miocárdica: receptores de adenosina (A1, A3), de purina (P2Y), de endotelina (ET1), de Acetilcolina (M2), adrenérgicos alfa 1 y beta, de angiotensina II (ATII), de bradiquinina (B2) y de opioides (delta 1 y kappa). En esta línea, Hanouz y cols. analizaron en estudios in vitro cómo el preconditionamiento con halogenados en el tejido miocárdico se producía a través de la activación de receptores de adenosina A1, alfa y beta, y canales mitocondriales de potasio ATP dependientes. Estos receptores van a provocar una señal intracelular mediada por la proteína G, que son los segundos mensajeros de mayor importancia entre las vías de señalización y transmiten el estímulo desde estos receptores hacia la fosfolipasas C y D iniciando la síntesis de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) que activarán la liberación de Ca²⁺ desde el retículo y a las diferentes isoformas de la PKC. (Zaugg M et al, 2003) (Hanouz JL et al, 2002) (Hu ZY et al, 2009)

La PKC es activada por las proteínas G, fosfolípidos, DAG, Ca²⁺, ROS y NO y genera una señal que es transmitida hasta los efectores, los KATP de la mitocondria y del sarcoplasma. La activación de la PKC es esencial para muchos autores ya que se considera el mediador común de muchas vías involucradas en la cardioprotección. La cascada continúa con la activación de otros intermediarios como la tirosin kinasa además de la PKC. Estos sistemas acoplados estimulan a su vez a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Una vez que han sido activadas se traslocan al núcleo celular para activar genes específicos que derivan en la actuación sobre efectores intracelulares o de membrana KATP (preconditionamiento precoz), o en la síntesis de la proteína citoprotectora (preconditionamiento tardío) para desencadenar la cardioprotección contra el daño isquémico. (Kunst G et al, 2015) (Uecker M et al, 2003) (Obal D et al, 2005)

En un modelo de preconditionamiento anestésico se ha descrito el beneficio que producen los halogenados en la lesión por isquemia-reperusión, al atenuar tanto la activación de NF-KB como la expresión de sus genes, reguladores de la inflamación durante la reperusión. Se ha demostrado cómo al utilizar sevoflurano, el NF-NK actuó como un trigger y mediador, al regular la proteína de apoptosis Bcl-2 en el periodo de preconditionamiento, y las proteínas inflamatorias ICAM-1 y TNF- α , en el periodo de reperusión. (Novalija E et al, 2002)

Existe una amplia evidencia de que la interacción entre las mitocondrias y ROS actúan como desencadenantes de la protección miocárdica. En el inicio de la reperusión se genera una ráfaga de ROS que contribuye a la depresión miocárdica por alteraciones en la homeostasis intracelular y daño en la membrana celular entre otros, sin embargo, pequeñas cantidades pueden tener efectos beneficiosos durante la isquemia. En el preconditionamiento con halogenados se generan bajos niveles de ROS, probablemente a través de la interacción directa o indirecta del agente anestésico con el complejo I y / o III de la cadena de transporte de electrones. Se ha descrito que la estimulación de los KATP aumenta la formación de ROS, que activan más proteínas quinasas (PK). Los radicales libres también pueden servir como disparadores para inducir la apertura de los KATP mitocondriales que, posteriormente, generan ROS adicionales requeridos para el preconditionamiento. (Novalija E et al, 2002) (Pravdic D et al, 2012) (Kowaltowski AJ et al, 2001)

1.8.5. Mecanismos de postcondicionamiento

Los mecanismos moleculares del postcondicionamiento podemos separarlos en *triggers*, vías intracelulares y efector final común. (Wagner R et al, 2014)

La activación de los receptores de adenosina, bradiquinina y opioides, son determinantes del inicio de la cardioprotección del postcondicionamiento. Estos son receptores ligados a proteínas G y su estímulo, genera una cascada intracelular a través de segundos mensajeros, que finalmente llevan a la protección celular mediante un efector final. Las vías intracelulares de segundos mensajeros implicadas son dos: la vía RISK y la vía SAFE, y el efector final en el que confluyen ambas, es el poro de transición mitocondrial (mPTP). (Lemoine S et al, 2016) (Xia Z et al, 2016)

Además en el postcondicionamiento miocárdico inducido por desflurano, la PKC juega un papel fundamental ya que activa multitud de vías incluidos los KATP. (Lemoine S et al, 2010)

1.8.5.1. Vía RISK

La apoptosis de las células miocárdicas, está incrementada durante el periodo de reperusión. Hausenloy and Yellon. denominaron "RISK (*Reperfusion Injury salvage Kinase*) Pathway" , a

las vías antiapoptóticas ligadas a caspasas, cuya activación farmacológica durante las fases tempranas de la reperfusión, limita la lesión inducida por la reanudación del flujo sanguíneo. Esta ruta enzimática está formada por las Fosfatidilinositol Trifosfato Kinasa (IP3 K/ Akt) y la Protein Kinasa regulada extracelularmente 1/2 (MEK /ERK1/2). (Hausenloy DJ et al, 2004)

El postcondicionamiento inducido por Sevoflurano activa (a través del estímulo de las vías de IP3 K/Akt y MEK/ERK1/2) a las proteínas Akt, ERK1/2, p70s6 K (70 kDa protein-kinasa S6 ribosomal) y la NOS (Óxido Nítrico Sintetasa).

La p70s6 K inhibiría la activación de la Kinasa 3β Glicógeno Sintetasa (GSK3beta).El Óxido Nítrico (NO) producido por la NOS, y la GSK3beta inhibida, inhibirían la apertura mPTP. (Lemoine S et al, 2016)

El NO tiene un doble efecto cardioprotector, gracias a sus efectos directos de vasodilatación y antiinflamatorio y, por otra parte, de manera indirecta inhibe la GSK3beta, y abre los canales KATP, lo que estabiliza la membrana mitocondrial, disminuye la sobrecarga celular de Ca²⁺ e inhibe la apertura del mPTP. (Sanada S et al, 2011). Así, el postcondicionamiento por Sevoflurano tiene efectos antiapoptóticos gracias a la preservación de la integridad mitocondrial a través de la inhibición de la apertura del mPTP. (Lemoine S et al, 2016)

1.8.5.2. Vía SAFE

La vía SAFE (*Survivor Activating Factor Enhancement*) ha sido identificada como una ruta enzimática responsable del pre y del postcondicionamiento, independiente de la vía RISK. Esta cascada incluye la activación del Factor de Necrosis tumoral alfa (TNFα) y el STAT-3 (*signal transducer and activator of transcription -3*). El TNFα activado en el curso de la reperfusión parece tener efectos contrapuestos según su concentración, ya que a concentraciones elevadas y mediante su unión al Receptor 1 (TNFαR1) favorece la apoptosis y la disfunción miocárdica, mientras que, a bajas concentraciones en fases iniciales de la reperfusión y, unido al Receptor 2 (TNFαR2), es una vía fundamental de cardioprotección que, además, limita la producción de TNFα y el efecto nocivo del mismo en las fases tardías. (Xia Z et al, 2016) (Lacerda L et al, 2009)

1.8.6. Estudios en clínica

Los estudios en clínica que han evaluado la administración del anestésico volátil previo a la isquemia miocárdica han demostrado menor daño miocárdico a través de los niveles de troponina I y mejor función miocárdica. (Belhomme D et al, 1999) (Julier K et al, 2003). Las consecuencias de este efecto protector son la reducción de tiempo de estancia en las unidades de

críticos y una disminución de la morbilidad (Landoni G et al, 2007) (Landoni G et al, 2008).

El grupo de trabajo de De Hert ha realizado múltiples estudios comparando pacientes anestesiados con propofol frente a otros anestesiados con sevoflurano, demostrando mejor función ventricular postoperatoria, menor liberación de troponina I, menor tendencia en la mortalidad y menos estancia hospitalaria en el grupo de sevoflurano. Además, demuestra que la duración de la exposición al halogenado, comprendiendo los momentos tanto previos como posteriores al episodio de isquemia, mejora estos resultados. (De Hert et al, 2002) (De Hert et al, 2003) (De Hert et al, 2004) (De Hert et al, 2009)(Guerrero JL et al, 2013) (Guerrero et al, 2017)

Landoni también publica varios metaanálisis donde muestra reducciones significativas en la morbilidad en los pacientes que pertenecen al grupo de anestésicos volátiles. (Landoni et al, 2007) (Landoni et al, 2013)

Ballester evaluó los niveles de estrés oxidativo durante la cirugía cardíaca sin CEC, mediante el análisis de la peroxidación de lípidos y biomarcadores de estrés. Estos se mantuvieron constantes en el grupo sevoflurano, mientras que se incrementaron significativamente en el grupo control que recibió propofol. (Ballester M et al, 2011)

Sin embargo, Xia realizó un estudio sobre 54 pacientes en el que se administraron altas dosis de propofol (120mcg/kg/min), bajas dosis de propofol (60mcg/kg/min) o isoflurano durante la bomba. Sus resultados fueron menores niveles de troponina I, un mejor índice cardíaco y menores requerimientos de inotrópicos en el primer grupo en comparación con los otros dos. Una explicación para este hallazgo pudo ser el tiempo de pinzamiento aórtico en todos los grupos, que superó 80 min. Del mismo modo, Piriou mostró que la administración de sevoflurano a 1 CAM durante 15 min antes de la CEC no producía mejores resultados que el uso de propofol en la disminución de los marcadores de daño miocárdico. Entre las posibles causas del resultado negativo de este ensayo se incluyen la dosis, que pudo haber sido demasiado baja, el patrón de administración o el tiempo de administración, que pudo ser demasiado corto y/o el período de lavado demasiado largo. (Xia Z et al, 2006) (Piriou V et al, 2007).

Nuestro grupo de trabajo prolongó la administración de anestésico a las seis primeras horas del postoperatorio comparando resultados entre el grupo anestesiado con propofol y el anestesiado con sevoflurano en base a parámetros hemodinámicos y marcadores bioquímicos. El resultado fue que la administración postoperatoria de sevoflurano prolongaba los efectos beneficiosos del precondicionamiento conseguido con halogenados intraoperatorios. Los resultados de este

estudio sirvieron a este mismo grupo de trabajo para desarrollar un ensayo clínico comparando tres grupos de pacientes; en el primero de ellos se administró propofol tanto en el intraoperatorio como en el postoperatorio, en el segundo, se administró sevoflurano intraoperatorio y propofol postoperatorio y en el tercero sevoflurano durante todo el período. Los requerimientos de inotrópicos y los niveles de NT- proBNP y troponina I fueron menores en el tercer grupo y a su vez, menores en el segundo que en el primero. De esta manera, concluyen que la administración de sevoflurano en el intraoperatorio y postoperatorio inmediato era el régimen terapéutico de mayor beneficio para este grupo de pacientes, probablemente gracias al postcondicionamiento tardío (Guerrero JL et al, 2013) (Guerrero JL et al, 2013)

Steurer dividió 56 pacientes en dos grupos para comparar la potencia cardioprotectora del sevoflurano en el postoperatorio de los pacientes en comparación con propofol, administrando a ambos grupos propofol en el intraoperatorio. Sus resultados fueron menores niveles de troponina T en el grupo de sevoflurano aunque sin cambios en los días de estancia hospitalaria. De esta forma confirmó que el sevoflurano postoperatorio es cardioprotector y puede ser una herramienta terapéutica en la prevención y tratamiento de la isquemia y disfunción miocárdica postoperatorias. (Steurer MP et al, 2012).

Dos estudios llevados a cabo por el grupo de trabajo de Soro y de Hellström no encontraron diferencias en el grado de lesión miocárdica ni en los días de estancia en UCI u hospitalaria y probablemente se debiera a que no se mantuvo el inhalatorio durante el tiempo de CEC, ya que se ha demostrado que sólo existían variaciones significativas con el uso intraoperatorio de sevoflurano en comparación con el propofol cuando se administró de manera continua (incluida la CEC) (Soro M et al, 2012) (Hellström J et al, 2011) (De Hert SG et al, 2002) (De Hert SG et al, 2004) (Guerrero JL et al, 2013) (Guerrero et al, 2017)

1.8.7. Enzimas relacionadas con el acondicionamiento

El grupo de trabajo de Guerrero y cols. tras conocer los resultados de estudios previos deciden realizar un ensayo clínico para evaluar los mecanismos del acondicionamiento y medir los mediadores que concurrían para conseguir tal efecto. El objetivo primario de este estudio era explorar el comportamiento de las enzimas involucradas en el acondicionamiento miocárdico con la administración de sevoflurano durante el intra y el postoperatorio (grupo SS), sólo durante el intraoperatorio (grupo SP) o con el uso de propofol durante el intra y el postoperatorio (grupo PP) en pacientes sometidos a revascularización miocárdica sin CEC. Además, entre los objetivos se incluía encontrar una relación entre el comportamiento de estas enzimas, el infarto de miocardio y la necesidad de apoyo inotrópico en cada grupo. Estos autores concluyen que el mecanismo por el cual se consiguen las propiedades cardioprotectoras del sevoflurano es la sobreexpresión de enzimas reguladoras de pre y postcondicionamiento.

Este grupo refleja un menor daño miocárdico en el grupo de sevoflurano intra y postoperatorio evidenciado por menos niveles plasmáticos de troponina I y lo relacionan con un aumento en las concentraciones plasmáticas de receptor de adenosina a las 24 horas en los grupos SS y SP y con una disminución de los mismos en el grupo PP. Los receptores de membrana desencadenan la señal que activará la proteína quinasa G y los grupos enzimáticos RISK y SAFE. En este estudio la proteína quinasa G se muestra elevada en el grupo SS, mientras que se encuentra disminuida en el grupo SP y más pronunciadamente en el grupo PP. Estos resultados están en concordancia con otros donde niveles elevados de adenosina y bradiquinina después del pre y postcondicionamiento disparan la cascada de la protección miocárdica. (Guerrero et al, 2017) (Fox AA et al, 2010) (Lotz C et al, 2015) (Lemoine S et al, 2016)

Según el mismo trabajo de Guerrero y cols. en el grupo SS se elevaron las enzimas del grupo RISK mientras que fueron menores en el grupo SP y aún más significativamente en el grupo PP. En cuanto a las enzimas del grupo SAFE, especialmente en los niveles de STAT 3, observaron una disminución de los niveles entre los basales y a las 24 horas en el grupo SP y especialmente en el PP y un incremento en el grupo SS, aunque este último no significativo. El NO y óxido nítrico sintasa inducible son mediadores del acondicionamiento y mostraron un discreto incremento en el grupo SS que se podría asociar a una regulación positiva pero no a una sobreproducción deletérea. Finalmente, midieron los niveles de caspasa 3 que se elevan durante la apoptosis y la muerte celular encontrando diferencias estadísticamente significativas en el grupo SS pero no en los otros dos grupos. (Guerrero et al, 2017)

1.9. MicroRNA

1.9.1. MicroRNA y control genético postranscripcional

Los microRNAs (miRNAs) son un grupo de pequeños RNAs no codificantes de unos 22-25 nucleótidos de cadena simple que inhiben la expresión de múltiples genes objetivo mediante la degradación o inhibición traslacional de sus RNA mensajeros (mRNA). Se descubrieron inicialmente en un nematodo en los años 90 donde se descubrió que el gen lin-4 codificaba un pequeño RNA responsable de la regulación de la sincronización del desarrollo en nematodos a través de la supresión de la expresión de la proteína LIN-14. (Porrello ER, 2013) (Lee et al, 1993)

La conservación evolutiva de estos miRNAs a través de todos los eucariotas, incluidos los vertebrados se descubrió casi una década después de su descubrimiento en nematodos. Actualmente se reconoce que el genoma humano contiene más de 1000 miRNAs y se presume que, más de un tercio de los genes codificantes de proteínas del genoma mamífero, están

regulados por al menos un miRNA. (Pasquinelli AE et al, 2000) (Reinhart BJ et al, 2000) (Lewis BP et al, 2005)

Los miRNAs son transcritos por la ARN polimerasa II como ARNs precursores largos llamados pri-miRNAs (miRNAs primarios), que son procesados secuencialmente por enzimas en el núcleo y el citoplasma para generar miRNAs maduros de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. Los pri-miRNAs se escinden en el núcleo por la endonucleasa RNasa III *Drosha*, que se asocia con la proteína de unión a ARN bicatenario DGCR8 y otros cofactores, para producir miRNAs precursores (pre-miRNAs) de aproximadamente 70 nucleótidos con forma de horquilla característica. Estas horquillas se transportarán al citoplasma donde otra endonucleasa RNasa III llamada *Dicer*, los escindirán para liberar miRNA de 22 nucleótidos de cadena doble. Una de estas cadenas se convertirá en el miRNA maduro y la otra generalmente, aunque no siempre, será rápidamente degradada. (Bartel DP, 2009) (Yang JS et al, 2011)

Algunos miRNA que se conocen como mirtrons pueden pasar por alto el procesamiento de *Drosha* y el pre-miRNA se genera directamente mediante el empalme de secuencias intrónicas (Okamura K, 2007)

La cadena de miRNA maduro se une a proteínas de la familia argonauta formando complejos RNA-proteínas llamados RISC (*RNA-Induced Silencing Complexes*: complejos de silenciamiento inducidos por ARN). Estos complejos silencian de forma específica los RNA mensajeros que contienen una secuencia complementaria a la del miRNA guía. La asociación de miRNA con su mRNA objetivo generalmente resulta en la degradación del RNAm y/o la inhibición de su traducción, sin embargo, se han publicado algunos casos de activación de la traducción. El principal determinante de la unión es el apareamiento de los nucleótidos 2-7 en el extremo 5' del miRNA maduro (conocido como la región *semilla*) y el mRNA objetivo (Bartel DP, 2009) (Vasudevan S et al, 2007). Los miRNAs regulan negativamente la expresión génica degradando el mRNA o directamente mediante inhibición traslacional, aunque la evidencia actual sugiere que el mecanismo principal para la represión del gen diana mediada por miRNA es a través de la desintegración del RNAm en lugar de la represión traslacional. (Guo H et al, 2010) (Hullinger TG et al, 2012)

Las *familias* de miRNA se clasifican en base a una región *semilla* común que es compartida por todos los miembros de la familia y que parece tener en gran parte funciones redundantes. Sin embargo, las otras regiones del miRNA son también importantes para la especificidad y la estabilización de la unión miRNA-mRNA. (Shin C et al, 2010).

Las estimaciones actuales basadas en estudios bioquímicos de identificación de miRNA sugieren que un solo miRNA puede interactuar con cientos de mRNA objetivos en una célula,

aunque la regulación de genes diana es típicamente modesta alcanzando de media un 25-50% de cambios en la expresión. De manera similar, análisis proteómicos indican que la mayoría de los objetivos son modestamente reprimidos (<2 veces). Sin embargo, a pesar de esta modesta represión, la redundancia de la región semilla, la promiscuidad de la interacción entre los miRNAs y los transcritos objetivo, la unión de un mismo transcrito con diferentes miRNAs, así como el potencial para generar múltiples RNAs maduros a partir de un mismo precursor permite una enorme complejidad regulatoria y funcional. (Guo H et al, 2010) (Shin C et al, 2010) (Hendrickson DG et al, 2009) (Baek D et al, 2008) (Selbach M et al, 2008) (Humphreys DT et al, 2012)

Como reguladores de la expresión génica, los miRNAs participan en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Según la estadística, los miRNAs regulan directamente más del 30% de los genes que están asociados con casi todas las funciones celulares mayores, incluyendo el crecimiento celular, proliferación, diferenciación, migración y apoptosis. Varios estudios previos han evidenciado que los miRNAs tienen roles significativos en enfermedades cardiovasculares que incluyen el daño miocárdico por isquemia-reperfusión (IR), la hipertrofia miocárdica, arritmias e insuficiencia cardíaca. (Chen LJ et al, 2012) (Boon RA et al, 2015) (Heymans S et al, 2013) (Danielson LS et al, 2013) (Thome JG et al, 2015)

Son numerosos los estudios publicados que asignan a los miRNAs un papel importante en la protección contra el daño miocárdico por isquemia-reperfusión, actuando como reguladores de la apoptosis de células cardíacas pudiendo ejercer como factores pro o antiapoptóticos. (Zhu H et al, 2012) (Li P, 2010) (Eisendhart SU et al, 2015) (Hu Q et al, 2016) (Liu Q et al, 2015) (Glass C et al, 2011)

El miRNA-21 se ha mostrado elevado de forma consistente en la hipertrofia cardíaca y parece ser relevante en la inhibición de la apoptosis celular. De hecho, se ha demostrado que varias dianas del miRNA-21 se encuentran relacionadas con el daño miocárdico por IR como la fofatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN), la proteína de muerte celular programada 4 (PDCD4) y las proteínas *sprouty* 1 y 2. (Yang KC et al, 2012) (Cheng Y and Zang C, 2010)

El grupo de trabajo de Yang y cols. estudió el papel antiapoptótico del miRNA-21 en ratas y en células de corazón embrionario de rata denominadas H9C2, sobre las que simulaban un daño por isquemia reperfundida. Estos autores encontraron que el miRNA-21 tenía un papel antiapoptótico en el daño por isquemia reperfundida *in vivo* y en el daño por hipoxia-reperfundida *in vitro*. Publican que este miRNA puede estimular la vía de señalización de la Akt, suprimiendo la expresión de PTEN. Esta actividad incrementada de Akt inhibía la apoptosis celular, parcialmente mediante la regulación al alza del ratio Bcl-2/Bax, que puede reducir la expresión de caspasa-3. (Yang Q et al, 2014). Este efecto importante cardioprotector del miRNA-21 se ha

reflejado en otros estudios con diseños diferentes. Wang comparó los efectos paracrinos de células madre de diferentes tejidos y halló una superioridad de las células madres mesenquimales derivadas de endometrio sobre aquellas procedentes de médula ósea o tejido adiposo y relacionó esta superioridad con la liberación de cantidades importantes de miRNA-21 por parte de las primeras así como una potenciación de la vía de señalización de la Akt e inhibición de PTEN. El bloqueo de miRNA-21 en este estudio hacía desaparecer los efectos beneficiosos de estas células, dando aún más consistencia a estos hallazgos. (Wang k et al, 2015)

En una línea de trabajo similar pero con resultados apuntando en dirección contraria, el grupo de trabajo de Liu y cols. estudió el miRNA-135a en células H9C2 a las que se provocó una situación de daño por isquemia-reperfusión mediante el uso de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Estos autores encontraron los niveles de la proteína Bcl-2 disminuidos en estas células así como altos niveles de miRNA-135a. Administrando un inhibidor de este miRNA, vieron cómo los niveles de Bcl-2 se elevaban y la apoptosis disminuía y, al contrario, cuando administraban un simulador de este miRNA, los niveles de Bcl-2 caían y la apoptosis aumentaba. Además de esto, bloquearon en otro grupo de células la Bcl-2 y constataron que entonces el miRNA-135a no tenía capacidad sobre la apoptosis, de manera que concluyeron que el miRNA-135a regulaba la apoptosis parcialmente a través de la regulación de la proteína Bcl-2. (Liu N et al, 2017)

El grupo de trabajo de Zhang inoculó miRNA-122 en cultivos de cardiomiocitos de ratón, hallando que este microRNA promovía la apoptosis así como una regulación al alza de la expresión de caspasa-8, rápido desencadenante de la cascada de caspasas, sugiriendo un papel futuro de esta molécula en la terapéutica del infarto de miocardio. (Zhang ZW et al, 2017).

En esta línea terapéutica Xu estudió en cultivos de cardiomiocitos de rata mediante la inoculación de TNF α cómo aumentaba la apoptosis, relacionando esto con un aumento en la expresión del factor inductor de la apoptosis (AIF) y una caída en el miRNA-186. Sin embargo, la administración de un simulador de miRNA-186 en estas células, las protegía de la apoptosis mediada por el TNF α , lo que implica, que este miRNA puede ser una diana terapéutica potencial para prevenir la respuesta inflamatoria asociada al daño cardíaco. (Xu h et al, 2017)

Baars y cols. estudiaron la relación entre los miRNA y el postcondicionamiento isquémico en cerdos anestesiados a los que ocluían temporalmente la arteria coronaria descendente anterior y o bien liberaban directamente o bien liberaban tras varias aperturas parciales, estimulando postcondicionamiento isquémico. Encontraron elevados los miRNA-29b, -133a y -146b en aquellos cerdos con postcondicionamiento. Asociaron un papel biológico sólo al miRNA-133a, ya que mostraba un efecto antiapoptótico disminuyendo la expresión del gen de la caspasa relacionado con la apoptosis (Casp9). Estos resultados son consistentes con estudios previos

donde la administración de un imitador de miRNA-133a disminuía la expresión de Casp9, mientras que su antagonismo elevaba la expresión de este gen. (Baars T et al, 2014) (He B et al, 2001)

Otros autores también han relacionado la elevación del miRNA-15a estudiada de nuevo en células H9C2 con aumento de la apoptosis mientras que su inhibición protegía contra la apoptosis inducida por isquemia-reperfusión. (Yang Y et al, 2017). En la misma línea que estos resultados, se ha publicado que la inhibición del miRNA-128 provoca efectos antiapoptóticos en el corazón de conejo lesionado por isquemia reperfundido. (Zeng XC et al, 2016)

En un estudio reciente se ha evaluado la elevación de miRNAs debido a preconditionamiento isquémico remoto en pacientes anestesiados con isoflurano. Estos autores encontraron una elevación en cuatro miRNAs, concretamente miRNA-28, 320, 92a y 21 tras el preconditionamiento isquémico y lo relacionaron con acondicionamiento miocárdico en los pacientes anestesiados con isoflurano reflejado en menores niveles de troponina postoperatorios. (Frey UH et al, 2019)

1.9.2. Determinación de microRNA

Las publicaciones de miRNAs se han realizado generalmente a través de la obtención de los mismos mediante microarrays. Esta técnica ha sido ampliamente usada en las dos últimas décadas con excelentes resultados por una mayor facilidad, menor requerimiento de personal y costes más limitados. Sin embargo, en este estudio buscamos qué miRNAs se relacionan con la cardioprotección de estos pacientes que, pueden no coincidir con aquellos conocidos en otras especialidades médicas o en ciencias básicas y que, usando microarrays no serían detectados, puesto que esta técnica sólo arroja resultados de aquellas muestras para las que se han diseñado sondas. Así, necesitamos un análisis completo, es decir una secuenciación que conseguiremos a través del método NGS (*Next-generation sequencing*). En general, englobaremos dentro de esta técnica todas las tecnologías encaminadas a una secuenciación masiva a gran escala de ácidos nucleicos. Esta técnica, bastante más compleja y con costes muy por encima de los microarrays, permitirá detectar aquellos miRNAs que se relacionen con los mecanismos de pre y postcondicionamiento observados con la administración de sevoflurano. Una vez detectados con esta técnica, se podrán estudiar en mayor número de pacientes aquellos miRNAs que sean significativos, es decir, con un modo de búsqueda perfilado.

1.9.3. MicroRNA y anestesia

Varios son los estudios que han mostrado cómo el isoflurano, sevoflurano y otros anestésicos pueden influir en la expresión de ciertos miRNA en el hígado y las neuronas. Con estos antecedentes y los conocimientos más profundos de las acciones del miRNA-21, el grupo de trabajo de Olson se plantea que el isoflurano protege a los cardiomiocitos del estrés oxidativo a través de la regulación al alza de este microRNA. Estos investigadores expusieron cardiomiocitos neonatales de rata a isoflurano *in vitro* y también ratones sanos *in vivo* y observaron cómo la cardioprotección inducida por sevoflurano se correlacionaba con una elevación de los niveles de miRNA-21. Además el bloqueo de este miRNA, hacía desaparecer los efectos cardioprotectores de este anestésico. Este mismo estudio, investiga qué miRNA, además del -21 se elevan con este anestésico y destacan la familia del miRNA-30 y el miRNA-210. Estos miRNA se han relacionado previamente con vías cardioprotectoras. Este mismo grupo de trabajo posteriormente, investigó cómo la elevación de este microRNA debida al isoflurano conseguía este efecto y vieron cómo generaba cardioprotección gracias al aumento de las vías de la Akt, eNOS y nNOS y además, retrasaba la apertura de los mPTP. (Olson et al, 2015)

EL grupo de trabajo de Otsuki y cols. estudian los efectos del sevoflurano en la expresión de diversos miRNAs en el pulmón de rata tanto sano como dañado. Para conseguir un pulmón con lesión aguda randomizaron las ratas a tres grupos, uno control, un segundo grupo donde se estimulaba este daño mediante un lipopolisacárido y un tercer grupo en los que generaban el daño y, además, administraban sevoflurano. Concluyeron que la elevación del miRNA-155 está relacionada con la lesión inducida por el polisacárido y que, en el grupo donde se administró el sevoflurano, esta elevación estaba atenuada. (Otsuki T et al, 2015)

La modificación en los patrones de expresión de microRNAs se ha estudiado también comparativamente entre sevoflurano y propofol. Este estudio lo llevó a cabo el grupo de trabajo de Ishikawa y cols. en el hígado de rata sana. Estos investigadores dividieron las ratas en tres grupos; al primero lo anestesiaron con propofol, al segundo administraron sevoflurano y al tercero no le administraron ninguno de estos dos fármacos, usándolo como control. Las conclusiones de estos autores apuntan a que, efectivamente, los fármacos empleados en la anestesia de estos pacientes, influyen en la expresión de los miRNAs formando un patrón característico. (Ishikawa M et al, 2012).

2. Hipótesis

Los niveles de miRNAs en el suero de pacientes expuestos a sevoflurano en el intra y postoperatorio de cirugía de revascularización miocárdica sufren variaciones. Además, el efecto

cardioprotector de esta exposición del sevoflurano está relacionada con las variaciones en los niveles de miRNAs cardioprotectores, que pueden coincidir con los evidenciados previamente en modelos animales, y validados in vitro (let7b, 139-5b, 487b, 125b). Nos basamos en estudios previos de este grupo de trabajo realizados en clínica donde observamos un beneficio en el uso de anestésicos halogenados planteándonos un estudio retrotraslacional.

3. Objetivos

1. Analizar cuáles son los microRNAs (cardioprotectores) que varían cuando se administra sevoflurano en el intra y postoperatorio a pacientes de elevado riesgo de cardiopatía isquémica que se intervienen de cirugía coronaria, frente a aquellos que fueron anestesiados con propofol durante el mismo período.
2. Utilizar una técnica cuantitativa para medir la variación de los miRNAs cardioprotectores en pacientes de elevado riesgo isquémico que se exponen al sevoflurano intra y postoperatorio como medida de pre y postcondicionamiento.
3. Intentar correlacionar los niveles de expresión de varios microRNA en suero de pacientes de alto riesgo con la morbimortalidad de los mismos.

4. Material y métodos

4.1. Diseño del estudio

Ensayo clínico en fase IV, controlado y aleatorizado, con enmascaramiento doble ciego, realizado en el Hospital Universitario Virgen de la Victoria. Este ensayo clínico, aprobado en el Comité de Ética, está dividido en dos partes; en la primera, se hará un análisis inicial de los ocho primeros pacientes mediante secuenciación NGS (4 pacientes de cada grupo, 8 muestras). En la segunda parte y, en base a los resultados de la secuenciación de la primera parte, se analizarán el resto. Para la realización del proyecto de investigación se necesitarán muestras biológicas de origen humano. Las muestras serán gestionadas por el Biobanco, y serán obtenidas exclusivamente previa solicitud del consentimiento informado al paciente, de acuerdo a la normativa del Comité Ético, para la realización del proyecto por el Servicio de Anestesiología y Reanimación, en conjunto con el de Cirugía Cardíaca.

Ámbito del estudio: Pacientes adscritos al Hospital Virgen de la Victoria el cual tiene una población asignada como Hospital de Atención Especializada superior a los 470000 habitantes, distribuida en los Distritos Málaga, Valle del Guadalhorce y Costa del Sol, que integran un total de 18 Zonas Básicas de Salud.

En esta fase inicial del ensayo clínico se evaluaron en ocho pacientes la variación respecto a los valores basales en sangre de los distintos miRNAs, a las 24 horas de su entrada en quirófano. La asignación aleatoria de individuos a uno u otro grupo se realizará mediante el uso del software estadístico Epidat 4.0® (Sergas, Galicia, España).

Los pacientes reclutados se dividieron en dos brazos de estudio en base al tratamiento administrado.

1. Brazo de estudio 1: Anestesia y sedación postoperatoria con propofol
2. Brazo de estudio 2: Anestesia y sedación postoperatoria con sevoflurano.

4.2. Población de estudio

Los pacientes reclutables son los pacientes ingresados en el servicio de Cardiología del Hospital Virgen de la Victoria pendientes de intervención de cirugía de revascularización miocárdica sin CEC que cumplan criterios inclusión / exclusión.

Todos los pacientes fueron informados del estudio y la naturaleza del mismo, dando el consentimiento para su participación.

Criterios de inclusión:

1. Edad mayor o igual a 18 años.
2. Cirugía de revascularización coronaria sin bomba electiva.
3. EUROSCORE II menor de 3%. Esta escala europea está validada a nivel médico y científico y se considera de utilidad en el perioperatorio de los pacientes que se someten a cirugía cardíaca. Aquellos que están debajo del 3% se consideran de riesgo cardiológico bajo o moderado en el perioperatorio.
4. Nivel de riesgo anestésico de acuerdo a los criterios de la sociedad americana de anestesia (ASA) por debajo de 4 (riesgo anestésico moderado-alto).

Criterios de exclusión:

1. Antecedentes de reacción adversa a los fármacos empleados.
2. Enfermedad severa diagnosticada preoperatoriamente de cualquier órgano (pulmón, hígado, riñón).

3. Cirugía mixta o combinada (que, además de la cirugía coronaria, se lleve a cabo alguna otra en el mismo acto, como una cirugía valvular).
4. Pacientes que presenten inestabilidad hemodinámica, insuficiencia cardíaca o que precisen, de forma preoperatoria de fármacos vasoactivos o inotrópicos.
5. Paciente en tratamiento con antidiabéticos orales que no hayan cumplido la suspensión previa de al menos 48 horas.
6. Uso de eufilina/teofilina preoperatorio.
7. Cirugía de emergencia.
8. Incapacidad para otorgar el consentimiento informado
9. Embarazo o lactancia

4.3. Protocolo de estudio. Recogida de datos. Plan de trabajo

4.3.1. Protocolo de trabajo:

Los pacientes fueron reclutados en la Unidad de Gestión Clínica de Cardiología. Una vez hubieron firmado el consentimiento informado, fueron asignados de forma aleatoria a uno de los dos grupos. La aleatorización se realizó previa entrada al quirófano manteniendo en cada uno de ellos el fármaco del grupo del brazo de tratamiento asignado en la unidad de cuidados intensivos hasta la extubación del paciente. Se prevé un periodo de reclutamiento de pacientes de 24 meses para completar ambas fases del ensayo, siendo la duración del estudio en cada uno de ellos aproximadamente de entre 2 y 15 días (registro de alta de la unidad de cuidados intensivos y hospitalarios), limitando cada uno de los tratamientos a las primeras 12 horas desde el inicio de su intervención, hasta su extubación. En nuestro hospital la media anual de pacientes intervenido con las características de la muestra, está entre 75-80 pacientes/año. Los pacientes objeto de esta primera parte del ensayo fueron reclutados según lo descrito anteriormente en un periodo de dos meses y, por tanto, serán los que describamos a continuación.

El estudio se ha realizado de acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki. Además, se ha desarrollado de acuerdo con los protocolos y con los procedimientos normalizados de trabajo (PNTs) que aseguran el cumplimiento de las normas de Buena Práctica Clínica (BPC), tal y como se describe en las normas tripartitas de la ICH para la Buena Práctica Clínica 1996. Se enmarca dentro de la estrategia actual de desarrollo de ensayos clínicos independientes, como estudios de máxima validez científica en el campo de la salud. El abandono debe registrarse en la página apropiada del CRD (cuaderno de recogida de datos).

Los motivos para el abandono del paciente por parte del investigador incluyen, pero sin limitarse a ellos, los siguientes:

- a. No cumplimiento por parte del paciente y/o del investigador de los procedimientos y directrices del estudio.
- b. Retirada voluntaria o cualquier acontecimiento adverso significativo que comprometa la capacidad del paciente para participar en el estudio.
- c. La determinación del investigador de que continuar no va en el interés del paciente (por ejemplo, enfermedad o estado intercurrente que requiere el uso de fármacos o tratamiento prohibido). Todos los procedimientos de terminación del estudio deben realizarse en el momento del abandono.

4.3.2. Anestesia y procedimiento quirúrgico:

La medicación crónica del paciente se mantuvo hasta la cirugía, incluida la mañana de la misma, salvo aquellos en tratamiento con antidiabéticos orales que fueron sustituidos por insulina de acuerdo al protocolo hospitalario.

La monitorización que se llevó a cabo en estos pacientes fue electrocardiograma continuo de 5 derivaciones, incluyendo la II y la V, la monitorización invasiva de la presión arterial mediante catéter en la arteria radial que, además permite la monitorización continua del índice cardíaco gracias al sistema MostCare®, capnografía, pulsioximetría, temperatura faríngea, vesical y sanguínea e hipnosis mediante índice bispectral, BIS (BIS XP®; Aspect Medical Systems, Newton, MA).

- Grupo 1, anestesia y sedación postoperatoria con propofol (PP): Se induce anestesia con bolo de 0.3 mg/kg de etomidato, 4 mcg/kg de fentanilo y, posteriormente, se mantiene a través de una infusión continua de propofol (Diprivan®; AstraZeneca, Brussels, Belgium) mediante TCI ("target-controlled infusion") con una concentración plasmática objetivo de 2 mcg/mL y ajustado según el monitor de hipnosis BIS.

- Grupo 2: anestesia y sedación postoperatoria con Sevoflurano (SS): La inducción se realizó igual que en el grupo PP y el mantenimiento se llevó a cabo con sevoflurano (Sevorane®; Abbott, Louvain-la-Neuve, Belgium) ajustado por valores de BIS.

El BIS objetivo en estos pacientes es entre 40 y 60, ya que se asegura la hipnosis y se evita la sobredosificación. En ambos grupos se utilizó bloqueo neuromuscular de tipo no despolarizante con cisatracurio (Nimbex®; Glaxosmithkline, London, UK) con dosis de inducción de a.15 mg/kg y mantenimiento de 1-2 mcg/kg/min. Además, se mantuvo en ambos grupos una perfusión de remifentanilo (Ultiva®; GlaxoSmithKline, Genval, Belgium) intravenoso como

opioide de elección a un ritmo entre 0.1 - 0.2 mcg/kg/min y con uso de bolos puntuales según las necesidades quirúrgicas y el criterio del anesthesiólogo.

Las técnicas quirúrgicas decididas y empleadas por el cirujano fueron las habituales en su práctica clínica sin que existieran maniobras de acondicionamiento en ninguna de ellas. Los pacientes al finalizar la cirugía, fueron trasladados a la unidad de cuidados críticos postquirúrgicos o Reanimación como es práctica habitual. En esta unidad se mantuvieron sedados con el fármaco del grupo al que pertenecían, protocolizándose un período de sedación de seis horas con posterior extubación siempre que se reunieran las condiciones necesarias.

En Reanimación, los pacientes que pertenecían al grupo PP, se mantuvieron propofol mediante infusión TCI en torno a 1.5mcg/mL de concentración plasmática y ajustada según los parámetros de BIS, en este caso entre 60 y 70. El grupo SS, la sedación se llevó a cabo con sevoflurano gracias al dispositivo AnaConDa© (*Anaesthetic Conserving Device*, ACD; Sedana Medical, Uppsala, Sweden) con un end-tidal objetivo en torno al 0.5%-0.7% y ajustado para valores similares de BIS.

4.3.3. Determinación de variables hemodinámicas.

La medición continua del gasto cardíaco se hizo mediante MostCare® (MostCare Up®; Vigon, Ecoen, France), anotando los valores de índice cardíaco, índice de volumen sistólico y saturación venosa central. El resto de constantes hemodinámicas a registrar, frecuencia cardíaca, tensión arterial media y presión telediastólica de ventrículo derecho se registraron previas a la anestesia general (basal), tras anestesiarse e intubar al paciente, posterior al bypass coronario y a las 6, 12, 24 y 48 horas tras el inicio de la cirugía cardíaca.

4.3.4. Análisis bioquímico:

- Hematimetría
- Bioquímica: troponina I, CK (y CKMMB), NT-pro BNP y Proteína C reactiva (PCR).
- Gasometría arterial: PaO₂, PaCO₂, PH, EB y lactato.

Estas determinaciones se harán previas a la anestesia general, tras anestesiarse e intubar al paciente y, posterior al bypass coronario, a las 6, 12, 24 y 48 horas del inicio de la intervención, a excepción del NT- proBNP que solo se recogerá basal y a las 24 horas.

Las variables principales del estudio fueron:

CÓDIGO PACIENTE	NATURALEZA	ESCALA DE MEDIDA	TIPO
CKMMB	CUANTITATIVA	U/L	INDEPENDIENTE
TROPONINA I	CUANTITATIVA	ng/mL	INDEPENDIENTE

PCR	CUANTITATIVA	mg/L	INDEPENDIENTE
NT-PROBNP	CUANTITATIVA	pcg/mL	INDEPENDIENTE
INDICE CARDIACO	CUANTITATIVA	L/min/m ²	INDEPENDIENTE
ARRITMIAS	CUALITATIVA DICOTOMICA	SI/NO	INDEPENDIENTE
DIAS DE ESTANCIA EN UCI	CUANTITATIVA	DÍAS	INDEPENDIENTE
DIAS DE ESTANCIA EN HOSPITAL	CUANTITATIVA	DÍAS	INDEPENDIENTE
VALORES MICRORNA	CUANTITATIVA	Número de copias	INDEPENDIENTE
MORTALIDAD	CUANTITATIVA	%	INDEPENDIENTE

4.3.5. Enzimas involucradas en efectos beneficiosos

Las muestras sanguíneas se extrajeron de venas antecubitales y almacenadas en tubos (BD vacutainer, London, UK), previamente a la cirugía y a las 24 horas postoperatorias. Este sangre se sometió a centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos e inmediatamente congeladas hasta su análisis a través de kits de inmunoassays (serina/treonina proteína kinasa (Akt), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), proteína kinasa regulada extracelularmente (ERK 1/2) y caspasa 3).

4.3.6. Metodología para la determinación de miRNAs

Inicialmente, se ha hecho la determinación de secuenciación genética mediante NGS de los 4 primeros pacientes de cada grupo como hemos descrito para, posteriormente y, sobre las variaciones observadas, realizar las determinaciones cuantitativas de los miRNA que hayan alcanzado variación significativa.

Estudio por secuenciación masiva de la población de RNA (miRNA).

Se extrajo el miRNA con un kit específico (miRCURYTM RNA Isolation Kit- tissue and biofluids; Exiqon). Una parte se utilizó para la realización de una secuenciación de librerías de miRNA (Centro de Supercomputación y Bioinnovación. Universidad de Málaga) para estudiar el patrón de expresión de miRNA (n=8). Otra alícuota se utilizó para los análisis de confirmación de los resultados obtenidos a partir de los resultados de secuenciación mediante rt-PCR. Se obtuvo el cDNA con el kit Universal cDNA Synthesis (Exiqon). Se validó la calidad de la extracción y RT mediante un panel QC (miRCURY LNATM Universal RT miRNA PCR, 16 Ready-to-Use miRNA QC PCR Panels) en un Applied Biosystems Fast 7500 ((miRCURY

LNA™ Universal RT miRNA PCR, with synthetic RNA spike-in templates for qPCR control (UniSp2, UniSp4, UniSp5 RNA Spike-in template mix and cel-miR-39-3p RNA Spike-in template). Con los spike-in UniSp2, UniSp4 UniSp5 se evaluará la eficiencia de extracción, con los spike-in cel-39-3p y UniSp6 se evaluará la síntesis del cDNA y el con el spike-in UniSp3 la reacción de PCR).

Estudio de la calidad del RNA extraído para la ultrasecuenciación.

Una vez extraídas las diferentes muestras de miRNA, el RNA debía cumplir unos requerimientos mínimos de cantidad y de calidad para ser usadas en el proceso de secuenciación. Se analizaron la calidad usando el sistema de electroforesis on-a-chip con el equipo Bioanalizador 2100 (Agilent). Las muestras se cuantificaron con métodos fluorimétricos con el fluorímetro Qubit (Life Technologies) y se guardaron en alícuotas a -80oC hasta su procesado.

Una vez preparadas las librerías de miRNA, se realizó la secuenciación con el equipo NextSeq 550 (Illumina). Esta plataforma de secuenciación usa la tecnología de secuenciación por síntesis (SBS) de Illumina teniendo dos configuraciones de carrera: la carrera High, que genera 400 Millones de lecturas simples (800 Millones de lecturas pareadas) y la configuración Mid, que genera 130 Millones de lecturas simples (260 Millones de lecturas pareadas). Este equipo permite secuenciar aproximadamente 30 muestras de miRNAs por carrera (High) para obtener un mínimo de 5-10 millones de lecturas por muestras. Como control interno de secuenciación incluimos en cada carrera aproximadamente el 1% del control PhiX para verificar el correcto funcionamiento en los pasos de generación de cluster, secuenciación y tasa de error en el alineamiento. La técnica garantiza que el 75% de las lecturas tienen índices de calidad >Q30. Realizaremos una secuenciación simple 1x 50-75pb en el caso de los miRNAs.

Valoración experimental de la expresión de miRNA mediante RT- qPCR.

Se analizó la expresión de 8 miRNAs en las mismas muestras (n=4) mediante RT-qPCR (validación técnica), usando el kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription y siguiendo las instrucciones del fabricante (ThermoFisher Scientific Inc, Waltham, MA). Se evaluó la expresión de miRNAs mediante PCR a tiempo real usando sistema de reacción en cadena de la polimerasa Biosystems 7500 Fast Real Time. (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado para todos los miRNAs usando TaqMan™ MicroRNA Assay (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA): hsa-miR-197-3p (Ref: 477959_miR), hsa-miR-708-3p (Ref: 479162_miR), hsa-miR-636 (Ref: 478185_miR), hsa-miR-4685-3p (Ref: 479921_miR), hsa-miR-296-

3p (Ref: 478790_miR), hsa-miR-3199 (Ref: 479674_miR), hsa-miR-294 (Ref: 478693_miR) and hsa-miR-3176 (Ref: 478016_miR). El valor límite (Ct) para cada muestra se normalizó con la expresión de hsa-miR-126-5p (Ref:477888_miR). Los software SDS 2.3 y RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems, Foster City,CA) se utilizaron para analizar los resultado con el método Ct comparativo (2-DCt).

4.3.7. Acontecimientos adversos

Estaba prevista la comunicación de todo acontecimiento adverso que se detectara durante el desarrollo del protocolo clínico así como la recogida de información sobre acontecimientos adversos no graves en forma tabulada al final del protocolo o coincidiendo con los análisis intermedios cuando éstos estuvieran previstos, sin embargo, no se han registrado tales acontecimientos.

4.3.8. Análisis estadístico

Análisis de datos de expresión génica de miRNA utilizando la técnica RNA-seq.

Se realizó un análisis bioinformático para determinar qué miRNAs se encuentran diferencialmente expresados entre los distintos grupos de pacientes a comparar. El proceso de análisis implicó varias etapas:

1.- Preprocesamiento de los datos de lecturas para eliminar de los datos de lecturas aquellos nucleótidos de baja calidad, que pertenecían a los adaptadores de la técnica o que procedían de alguna fuente de contaminación. Para esta etapa utilizamos un software desarrollado en la Plataforma Andaluza de Bioinformática (PAB) denominado SeqTrimNext, que gracias a su funcionamiento de forma paralela y distribuida agilizó el procesamiento de grandes cantidades de datos como los procedentes de experimentos de NGS.

2.- Alineamiento de las lecturas a la referencia genómica, en este caso la última versión del genoma humano (hg38) con un pipeline optimizado para la identificación de distintas isoformas génicas o el descubrimiento de nuevos genes, TopHat, que es capaz de reconocer los sitios de procesamiento exón-intrón. El nivel de expresión se reportó en formato RPKM (lecturas mapeadas por millón). Para el miRNA, se realizó el alineamiento de las lecturas a la referencia, en este caso la última versión de las bases de datos de miRNA (<http://www.mirbase.org/>) con un pipeline optimizado para el alineamiento tanto a la forma inmadura como a la forma madura de los distintos miRNA, TopHat. El nivel de expresión se reportó en forma de número de lecturas mapeadas.

3.- En la tercera etapa se compararon los distintos grupos de datos para obtener aquellos genes con expresión diferencial. Este proceso implicó la normalización previa de los datos de expresión y la comparación de los grupos de datos.

4.- El resultado final fue una lista con los distintos genes o miRNA diferencialmente expresados que cumplen una serie de requisitos previos como son: estabilidad entre la población, nivel mínimo de expresión y significancia estadística.

Los resultados de estos experimentos están disponibles públicamente en el archivo de lectura (SRA) de la NCBI bajo el nombre (NCBI PRJNA594742).

Análisis del resto de datos.

Para el resto de análisis estadísticos, se usaron las técnicas estadísticas descriptivas usuales (prueba t de Student, Fisher o Man-Whitney U para el análisis entre grupos). Para las comparaciones de más de 2 grupos, se utilizó el análisis por ANOVA o Kruskal-Wallis. Para el estudio de la correlación entre las variables cuantitativas se realizó la prueba de Spearman. También se procedió con un análisis de regresión lineal múltiple, para estudiar la presencia o ausencia de colinealidad entre variables para determinar la validez de las correlaciones bivariadas. En cualquier caso, el nivel de rechazo de H_0 fue de 0,05. Todos los datos se expresaron como media \pm desviación estándar a menos que se indique lo contrario.

4.4. Anexos del material y métodos

- Anexo 1. Aprobación del Comité de Ética del Hospital Universitario Virgen de la Victoria
- Anexo 2. Consentimiento informado
- Anexo 3. Protocolo de recogida de datos



D^a Gloria Luque Fernández, como Secretaria del Comité de Ética de la Investigación Provincial de Málaga.

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la siguiente propuesta de ensayo clínico:

CÓDIGO: ACDHUVV-16
NUMERO EUDRACT: 2016-003413-10
TÍTULO: Análisis de la expresión de microRNAs en pacientes sometidos a cirugía cardíaca tratados con anestésicos halogenados. Identificación de microRNAs relacionados con el efecto cardioprotector
PROMOTOR: Fundación Pública Andaluza para la Investigación de Málaga en Biomedicina y Salud, FIMABIS
PROTOCOLO: Versión 1.0 Fecha: 04/02/2016
HIP/CI GENERAL: Versión 1.0 Fecha: 04/02/2016
Otras HIP/CI (subestudios, para uso futuro de muestras biológicas, etc).
Version 1.0 Fecha: 04/02/2016

Que este Comité ha realizado la evaluación de la parte I de la solicitud de autorización del ensayo, ha valorado las respuestas del promotor a las peticiones solicitadas (si las hubiera) y ha transmitido a la Agencia Española de Medicamentos su opinión final sobre la parte I.

Que este Comité ha realizado la evaluación de la parte II de la solicitud de autorización del ensayo, de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 1090/2015 y en el art 7 del reglamento (UE) 536/2014 y considera que:

El procedimiento para obtener el consentimiento informado (incluyendo las hojas de información al sujeto de ensayo y consentimientos informados mencionados en el encabezamiento), y el plan de reclutamiento de sujetos previsto son adecuados y cumplen con los requisitos para la obtención del consentimiento informado previstos en el capítulo II del Real Decreto 1090/2015.

Las compensaciones previstas a los participantes son adecuadas, así como las previsiones de indemnización por daños y perjuicios que pueda sufrir el participante.

El procedimiento previsto para el manejo de datos personales es adecuado.

El uso futuro de las muestras biológicas obtenidas durante el ensayo se adecua a lo previsto en el Real Decreto 1716/2011.

Para la realización del ensayo se consideran adecuados los centros e investigadores previstos en el anexo II a este dictamen, teniendo en cuenta las declaraciones de idoneidad emitidas por el promotor y por los responsables de las instituciones correspondientes.

Que este Comité decidió emitir DICTAMEN FAVORABLE en la reunión celebrada el día 24/11/2016

Que en dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente –Real Decreto 1090/2015 – para que la decisión del citado CEIm sea válida.

Que el CEIm Provincial de Málaga, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm Provincial de Málaga es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico.

En Málaga, a 16 de Diciembre de 2016

El Secretario CEIm Provincial de Málaga

Fdo.: Gloria Luque Fernández

Hoja de información al participante y documento de consentimiento informado

Título del estudio: "Evaluación del efecto beneficioso del uso de sevoflurano en comparación con el uso de propofol en cirugía cardíaca.."

Centro del estudio: Hospital Virgen de la Victoria

Lea detenidamente este documento

Le invitamos a participar en un estudio de investigación. Antes de que se decida a participar, es importante que entienda por qué se realiza esta investigación y en qué consistirá. Si algo no está claro o si desea más información, puede hacernos todas las preguntas que quiera. Estamos a su disposición para responder a cualquier pregunta que tenga, ahora o en cualquier momento durante el estudio.

¿CUÁL ES LA FINALIDAD DEL ESTUDIO?

Los estudios de investigación se realizan para encontrar la mejor manera de tratar a los pacientes. En los estudios de investigación pueden evaluarse fármacos u otro tipo de tratamientos.

En este estudio se comprobará el efecto que tiene el sevoflurano respecto al propofol, sobre los distintos marcadores de protección miocárdica. Ha sido seleccionado para este estudio porque va a ser sometido a cirugía de revascularización miocárdica sin CEC necesitando posteriormente sedación hasta su extubación en la unidad de Reanimación.

La finalidad de este estudio de investigación es evaluar el posible beneficio del sevoflurano en el perioperatorio de los pacientes sometidos a revascularización miocárdica sin bomba.

El sevoflurano es un fármaco usado desde hace más de 15 años en la labor rutinaria de un anestesiólogo, es un fármaco hipnótico. Es un fármaco muy seguro, y de uso muy extendido en la práctica clínica diaria.

El propofol es un fármaco usado desde hace mucho tiempo como hipnótico por parte de los anestesiólogos de los distintas partes del mundo. Asimismo, es un fármaco muy usado, y con un perfil de seguridad comprobado.

Un comité ético de investigación clínica independiente ha aprobado el estudio.

Se le ha pedido que participe en este estudio porque le han diagnosticado lesiones en sus arterias coronarias que hacen necesario que usted necesite que se le practique cirugía de revascularización miocárdica en principio sin circulación extracorpórea, siendo además un paciente de riesgo bajo-moderado para todo el procedimiento. Creemos que el tratamiento con sevoflurano podría ser eficaz para disminuir la respuesta oxidativa (asociada al daño del miocardio) y disminuir su estancia en la unidad de cuidados intensivos y hospitalarios, respecto a la técnica habitual con propofol y por eso le invitamos a participar en el estudio.

En el estudio participarán alrededor de 100 pacientes.

Mientras participe en este estudio, no podrá participar en ningún otro estudio de investigación médica.

¿QUÉ TRATAMIENTO RECIBIRÉ?

En este estudio hay tres grupos de tratamiento.

- Propofol en el intraoperatorio y postoperatorio.
- Sevoflurano en el intraoperatorio y postoperatorio.
- Sevoflurano en el intraoperatorio y propofol en el postoperatorio

Durante el estudio, usted no sabrá a qué grupo de tratamiento le han asignado. La hipnosis en el grado necesario en el intra y postoperatorio está controlada y asegurada a través de los monitores diseñados para ello.

¿CÓMO SE DECIDIRÁ SI RECIBO PROPOFOL , SEVOFLURANO O SEVOFLURANO Y PROPOFOL?

Cada paciente al que se permita participar en el estudio será asignado a un grupo al azar (aleatoriamente), como al lanzar una moneda al aire. La probabilidad de que usted reciba sevoflurano o propofol es del 33% (1 sobre 3).

¿QUÉ SUCEDE CON LA MEDICACION QUE TOMO Y LA CIRUGIA QUE SE ME VA A REALIZAR?

No existen interacciones, ni contraindicaciones de ningún tratamiento que usted toma, ni afecta la cirugía o número de vasos que se les van a revascularizar.

¿QUÉ SUCEDERÁ DURANTE EL ESTUDIO?

Se le sacaran determinados marcadores a través de analíticas, aprovechando los controles habituales que se realizan a los pacientes, que como usted, se someten a este tipo de intervención, ninguna de las dos posibilidades de sedación variará nuestro protocolo de trabajo habitual y medidas a tomar ante las distintas situaciones que se puedan dar en el perioperatorio.

¿QUÉ PROCEDIMIENTOS SE REALIZARÁN SI ACEPTO PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Visita de selección: Tendrá que realizar una visita de selección. En ella, una vez que haya firmado el documento de consentimiento para participar, el médico del estudio revisará su historia clínica. Si cumple los requisitos necesarios para entrar en el estudio se le comunicará que ha sido seleccionado. Las visitas durarán unos 30 minutos.

¿QUÉ PROCEDIMIENTOS SE REALIZARÁN DURANTE EL ESTUDIO?

Se harán las pruebas y los procedimientos descritos a continuación:

- **Monitorización de la función cardiaca a través de un monitor de gasto cardiaco.**
- **Extracción de sangre:** Le introducirán una aguja en una vena del brazo para extraerle sangre. Se realizaran las determinaciones habituales para su seguimiento incluyendo 2 determinaciones extraordinarias:
 - Esta sangre se utilizará para comprobar su estado general de salud y diversas mediciones bioquímicas
 - La cantidad total de sangre extraordinaria, extraída a cada paciente durante todo el estudio será de aproximadamente 40 ml.
- Puede que, en algunos casos, haya que repetir la extracción de sangre.
- Análisis de orina

¿ TENGO QUE HACER ALGO ANTES O DESPUES DE LA INTERVENCION RELACIONADO CON EL GRUPO DE ESTUDIO?

Si decide participar en este estudio, se compromete a que se le administre como fármaco hipnótico el que se le adjudique en la aleatorización. No tendrá que realizar ninguna modificación en su tratamiento antes ni después de la cirugía relacionada con el grupo al que esté asignado.

¿HABRA ALGUNA DIFERENCIA EN CUANTO A SEGURIDAD, DOLOR O NIVEL DE CONCIENCIA ENTRE AMBOS GRUPOS?

Cualquiera de los dos grupos, recibe fármacos completamente seguros y de práctica clínica habitual siendo de elección del anestesiólogo, asegurando los dos su hipnosis y por lo tanto que usted no sea consciente de lo que está sucediendo, esto lo controlamos a través de monitores fiables que registran su actividad cerebral. En ambos grupos se ponen protocolos analgésicos similares, no influyendo el tipo de anestesia recibida para ello, asegurándole el tratamiento intensivo para que usted no sufra dolor.

¿CUÁLES SON LOS POSIBLES EFECTOS SECUNDARIOS?

Posibles efectos secundarios del medicamento/tratamiento:

Ampos fármacos tienen un perfil seguro los efectos secundarios aunque todos los medicamentos pueden causar efectos no deseados, denominados efectos secundarios.

Los Efectos secundarios observados con mayor frecuencia con la administración de propofol incluyen:

* Sensación de dolor mientras se le está administrando la inyección para inducir la inconsciencia.

- * Descenso de la tensión arterial.
- * Cambios en su patrón respiratorio.
- * Algunas contracciones nerviosas y agitación.
- * Raramente, reacciones alérgicas.

Su anestesista monitorizará estos efectos y, si se producen, usted será tratado en consecuencia.

Los efectos secundarios observados con mayor frecuencia con la administración de Sevoflurano incluyen:

Se han observado náuseas y vómitos en el período postoperatorio, secuelas comunes de la cirugía y la anestesia general, que pueden ser debidas a la anestesia por inhalación, a otros agentes administrados durante o después de la operación, y a la respuesta del paciente al procedimiento quirúrgico.

Las reacciones adversas más notificadas son las siguientes:

En pacientes adultos: hipotension, náuseas y vómitos;

En pacientes ancianos: bradicardia, hipotension y náuseas

Efectos secundarios de las pruebas realizadas:

Extracción de sangre: la extracción de sangre puede causar un hematoma en el lugar de penetración de la aguja en la piel. Algunas personas se desmayan y, en casos raros, pueden producirse infecciones.

¿CUÁLES SON LAS VENTAJAS DE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

La participación en este estudio puede ayudarle a mejorar su situación cardiaca y disminuir el número de días en la unidad de cuidados intensivos y en el hospital, aunque no podemos garantizarle que vaya a obtener alguno de esos efectos beneficiosos. Puede ocurrir también que no obtenga ningún efecto beneficioso. Es posible que su participación en el estudio ayude a futuros pacientes.

¿QUÉ OTROS TRATAMIENTOS HAY?

En lugar de participar en este estudio, puede optar por recibir el tratamiento habitual. Aunque en la práctica clínica diaria se utilicen ambos fármacos de manera habitual para el intraoperatorio y postoperatorio siendo por lo tanto la utilización de los mismos lo normal durante el intra y postoperatorio. El anestesista del estudio responderá a todas las preguntas que quiera hacer sobre ellos.

Si decide no participar en este estudio, la asistencia médica que reciba de los médicos responsables de su tratamiento no cambiará y vigilarán estrechamente su salud.

¿QUÉ TENGO QUE HACER?

Mientras participe en el estudio, deberá hacer lo siguiente:

- Facilitar información correcta y exacta sobre sus antecedentes médicos y sobre su enfermedad actual.
- Comunicar al médico del estudio cualquier problema de salud que tenga.
- Comunicar al médico alergias y reacciones ante la exposición a cualquier fármaco anestésico.
- No participar en otros estudios de investigación médica.

ASPECTOS ECONÓMICOS DEL ESTUDIO

Los profesionales que participan en el mismo, incluido el investigador, no serán remunerados por realizar este estudio.

El paciente no recibirá remuneración alguna por participar en este estudio.

¿QUÉ OCURRIRÁ CON LA INFORMACIÓN QUE SE RECOJA SOBRE MÍ?

El médico del estudio conservará durante al menos 15 años sus registros médicos personales y una lista en la que se vinculará el nombre de cada paciente con su código numérico.

Las autoridades sanitarias, los miembros de los comités de ética y los empleados del centro del estudio tendrán acceso a esta lista y podrán comparar y verificar la información obtenida sobre usted en el estudio con la contenida en sus registros médicos. Su historia clínica no se hará pública, en la medida en que lo permita la ley. Al firmar este documento, autoriza el acceso directo a sus registros médicos por parte de las personas que tengan motivos legítimos para consultarlos.

Puede concertar una cita con el médico del estudio para consulta, cancelación o rectificación de la información obtenida sobre usted, así como solicitar que se corrijan los posibles errores conforme a la Ley 15/1999 de Protección de Datos Personales

¿QUÉ OCURRIRÁ SI CAMBIO DE OPINIÓN?

Su participación en este estudio es voluntaria. No está obligado a participar. También puede decidir participar ahora y cambiar de opinión más tarde, lógicamente hasta el momento en el que se le vaya a anestésiar. Su decisión no afectará a su asistencia habitual. No influirá en que usted reciba la asistencia, los medicamentos y el equipo que deba recibir.

El médico del estudio podrá retirarle de éste en cualquier momento, con o sin su conformidad. Esta decisión se tomará si:

- Por motivos médicos, lo mejor para usted es dejar de participar en el estudio.
- Se cancela el estudio.

¿CON QUIÉN DEBO PONERME EN CONTACTO PARA SOLICITAR MÁS INFORMACIÓN?

Si tiene alguna duda acerca del estudio, póngase en contacto con:

Dr. José Luis Guerrero Orriach

Investigador

Teléf.: 653387201

Si considera que este estudio le ha causado algún daño, póngase en contacto con:

Dr. José Luis Guerrero Orriach

Investigador

Teléf.: 653387201

Si tiene alguna duda sobre sus derechos como paciente que participa en un estudio de investigación, póngase en contacto con:

Dr. José Luis Guerrero Orriach

Investigador

Teléf.: 653387201

Si da su consentimiento, lea el texto siguiente y firmelo.

Este documento de consentimiento contiene información importante. Le ayudará a decidir si desea participar en este estudio. Si aún tiene alguna pregunta, hágasela al médico o a un miembro del personal del estudio antes de firmar este documento.

Consentimiento para participar en el estudio

- He leído esta información.
- Se ha redactado en un idioma que puedo leer y comprender.
- Me han explicado este estudio.
- Han respondido a todas mis preguntas sobre el estudio, los posibles riesgos, los efectos secundarios y la administración de la medicación del estudio a mi entera satisfacción.
- De acuerdo con esta información, accedo voluntariamente a participar en este estudio.

Recibirá una copia firmada de esta hoja de información al participante y documento de consentimiento informado.

Nombre completo del participante (en mayúsculas)

Firma del participante

Fecha dd-MES-aaaa

Nombre y apellidos de la persona que obtiene el consentimiento (en mayúsculas)

Firma de la persona que obtiene el consentimiento

Fecha dd-MES-aaaa

Cuando el sujeto o su representante legal no sepan leer o escribir, es obligada la presencia de al menos un testigo imparcial. El testigo imparcial deberá estar presente durante toda la conversación sobre el consentimiento informado. Cualquier otro uso del testigo (p. ej., sólo testigo de la firma) debe figurar expresamente en el DCI.

Declaración del testigo imparcial (obligatoria cuando el sujeto o su representante legal no sepan leer o escribir)

Confirmando que se ha explicado debidamente al paciente o a su representante legal la información contenida en el documento de consentimiento y que aparentemente la ha comprendido, y confirmando que el paciente o su representante legal han otorgado voluntariamente su consentimiento.

Nombre y apellidos del testigo imparcial (en mayúsculas)

Firma del testigo imparcial

Fecha dd-MES-aaaa

FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Este documento sirve para que usted otorgue su consentimiento para donar sus muestras biológicas, o las del sujeto al que representa, al Biobanco indicado, establecimiento público, sin ánimo de lucro, dependiente de la Consejería de Salud/del Servicio Andaluz de Salud, que acoge colecciones de muestras biológicas concebidas con fines diagnósticos o de investigación biomédica y organizadas como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino, donde serán conservadas hasta que se agoten por su uso, salvo que usted solicitara su eliminación. Las muestras biológicas son un excelente elemento para la investigación de enfermedades. A través de dichas investigaciones se podrán obtener datos que permitirán mejorar el conocimiento sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de multitud de enfermedades.

Esta hoja de información puede contener palabras que usted no entienda. Por favor, pídale al profesional sanitario que le explique la información que no comprenda. Tómese el tiempo necesario para decidir si quiere o no donar su muestra biológica y consulte a personas de su confianza si lo desea. Para consultas que desee plantear posteriormente, podrá dirigirse al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. Dirección: Parque Tecnológico Ciencias de la Salud. Centro de Investigación Biomédica. Avda. del Conocimiento s/n · 18100 Armilla · Granada · España · Correo electrónico. biobanco.sspa@juntadeandalucia.es

Las muestras biológicas donadas y sus datos clínicos asociados se utilizarán de conformidad con lo establecido en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (en adelante Ley de Investigación biomédica).

Es posible que la información obtenida de las investigaciones en las que se utilicen sus muestras no le genere un beneficio directo, pero habrá contribuido al avance de la medicina y del conocimiento de diversas enfermedades, lo que supondrá, sin duda, un beneficio para la sociedad.

La donación es voluntaria y altruista, por lo que usted no tendrá derecho alguno sobre los resultados que pudieran derivarse de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras, de conformidad con la normativa vigente. Su decisión de donar o no, no afectará negativamente a su asistencia sanitaria.

Existe un apartado en el consentimiento en el que podrá decidir si quiere que sus muestras se conserven de forma codificada (en cuyo caso se identifican con un código que protege su identidad) o anonimizada (eliminándose de forma irreversible toda vinculación con su identidad).

Sus muestras y los datos asociados a las mismas sólo se cederán a terceros que las utilicen en investigación biomédica de manera anónima o disociada. Si, por la naturaleza del proyecto de investigación en el que se utilizara su muestra se necesitaran datos clínicos adicionales, el Biobanco coordinaría la obtención de los mismos, siempre que la muestra no hubiera sido anonimizada.

1. LO QUE USTED DEBE SABER:

1.1. Obtención de las muestras

Las muestras serán obtenidas durante el procedimiento médico-quirúrgico al que va a someterse o se ha sometido durante su proceso asistencial, o a través de un procedimiento expreso para obtenerla, según lo indicado en el apartado del consentimiento referente a la obtención de muestras.

En el caso de que usted done las muestras obtenidas durante un procedimiento médico-quirúrgico asistencial, no existe ningún inconveniente adicional derivado de la donación de las mismas.

Si, por el contrario, las muestras fueran extraídas expresamente para la donación para investigación biomédica podrían existir inconvenientes vinculados con la obtención de las mismas, de las que será convenientemente informado en la hoja de información del procedimiento correspondiente.

1.2. Utilización de las muestras

Usted autoriza a que las muestras donadas sean utilizadas en investigación biomédica, pudiendo establecer restricciones a su utilización.

Las muestras sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación científicamente avalados, que cumplan las exigencias legales y los principios éticos que rigen la investigación en salud y que sean autorizados por los órganos competentes, de conformidad con lo establecido en la normativa vigente.

Cuando, por razones de salud, usted o su familia lo necesiten, podrán hacer uso de las muestras, siempre que no se hayan agotado o eliminado y no se encuentren anonimizadas.

1.3. Información relacionada con las muestras

Si lo solicita, el Biobanco le facilitará la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras donadas, si éstas no hubieran sido anonimizadas.

Al donar sus muestras al Biobanco, en este momento puede no saberse el lugar de realización de los análisis. El Biobanco mantiene un registro detallado del lugar de realización de los análisis realizados.

La información que se obtenga puede tener implicaciones para sus familiares, por lo que debe transmitirles dicha información.

1.4. Posibilidad de ponerse nuevamente en contacto

Puede que sea necesario ponerse en contacto nuevamente con usted, con el fin de recabar datos o muestras adicionales, o proporcionarle la información relevante para su salud, salvo que haya solicitado que las muestras sean anonimizadas.

1.5. Protección de datos y confidencialidad de la información

La información proporcionada en este apartado será aplicable siempre que sus muestras no se encuentren anonimizadas.

Los datos personales recabados serán confidenciales y tratados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y su normativa de desarrollo, y la Ley de Investigación biomédica.

Sus datos de carácter personal serán incorporados a un fichero automatizado, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, cuya titularidad corresponde al Servicio Andaluz de Salud. Sólo los responsables del Biobanco podrán identificar a quién corresponde cada muestra o dato, si no está anonimizada.

Podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, oposición y cancelación de sus datos personales, reconocidos en la citada Ley Orgánica 15/1999, con las limitaciones establecidas en dicha Ley. Para ello, deberá dirigirse a la Dirección General de Asistencia Sanitaria del Servicio Andaluz de Salud, Avenida de la Constitución, núm. 18, de Sevilla.

1.6. Derecho de revocación del consentimiento

Salvo que sus muestras se encuentren anonimizadas, podrá revocar o retirar, en cualquier momento, el consentimiento prestado. Para ello, deberá dirigirse al Biobanco, pudiendo solicitar la eliminación o la anonimización de las muestras.

Los efectos de la revocación no se extenderán a los resultados de las investigaciones llevadas a cabo con anterioridad.

1.7. Información relativa a análisis genéticos

Salvo que usted manifieste lo contrario en el apartado dedicado al consentimiento, se podrán realizar análisis genéticos.

Excepto si sus muestras son anonimizadas, tiene derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, así como de la información relativa a su salud derivada de dichos análisis.

Si no desea recibir dicha información y ésta fuera necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar o a un representante. La comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para evitar tal perjuicio.

1.8. Otras consideraciones

Una vez informado/a de los aspectos relacionados anteriormente en este documento, si decide donar dichas muestras deberá firmar el consentimiento informado para la donación.



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.

DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del/de la Donante:

DNI / NIE: nuhsa:

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

DNI / NIE:

PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre	Fecha	Firma
.....

CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. declaro bajo mi responsabilidad que he leído y comprendido el Formulario de Información, del que se me ha entregado un ejemplar.

He recibido suficiente información sobre la donación de muestras biológicas de..... al Biobanco y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas. He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Dichas muestras son:

- Excedentes del procedimiento médico-quirúrgico asistencia al que va a someterse o se ha sometido
- Tomadas mediante el procedimiento expreso.....

Asimismo, consiento el tratamiento de los datos clínicos asociados a las muestras.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratados de forma:

- _ Codificada (serán identificadas con un código que protege mi identidad, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o
- _ Anonimizada (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo establecer restricciones respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en

Autorizo que se pueda contactar conmigo posteriormente: SI NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo:.....

Autorizo recibir información sobre datos genéticos y datos relevantes para mi salud (Si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información)

Marque lo que proceda: SI NO

Sé que puedo revocar, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En , a de de

EL/LA DONANTE

EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:





CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.

DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del/de la Donante:

DNI / NIE: nuhsa:

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

DNI / NIE:

PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre	Fecha	Firma
.....		

CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. declaro bajo mi responsabilidad que he leído y comprendido el Formulario de Información, del que se me ha entregado un ejemplar.

He recibido suficiente información sobre la donación de muestras biológicas de..... al Biobanco y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas. He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Dichas muestras son:

- Excedentes del procedimiento médico-quirúrgico asistencia al que va a someterse o se ha sometido
- Tomadas mediante el procedimiento expreso.....

Asimismo, consiento el tratamiento de los datos clínicos asociados a las muestras.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratados de forma:

Codificada (serán identificadas con un código que protege mi identidad, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o

Anonimizada (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo establecer restricciones respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en

Autorizo que se pueda contactar conmigo posteriormente: SI NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo:.....

Autorizo recibir información sobre datos genéticos y datos relevantes para mi salud (Si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información)

Marque lo que proceda: SI NO

Sé que puedo revocar, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En , a de de

EL/LA DONANTE

EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:



HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

	<i>BASAL</i> <i>HORA: _____</i>	<i>RECU</i> <i>HORA: _____</i>	<i>6 H ± 30 m</i> <i>TRAS RECU</i>	<i>24 H ± 1H</i> <i>DESDE BASAL</i>	<i>48 H ± 1H</i> <i>DESDE BASAL</i>	<i>ALTA A</i> <i>PLANTA</i>
<i>IC</i>						
<i>SAT VO2</i>						
<i>FC</i>						
<i>TAM</i>						
<i>PVC</i>						
<i>IVS</i>						
<i>MEI</i>						
<i>FÁRMACOS</i> <i>INOTRÓPICOS Y</i> <i>VASOACTIVOS</i> <i>(número y dosis)</i>						
<i>CKMMB</i>						
<i>TROPONINA</i>						
<i>NT-PROBNP</i>						
<i>PCR</i>						
<i>VARIACIÓN DE LA</i> <i>FUNCIÓN RENAL</i>						
<i>Creatinina</i>						
<i>Lactico</i>						
<i>Htco</i>						
<i>MUESTRAS DE</i> <i>SANGRE (Adjuntar</i> <i>resultados del análisis</i> <i>de miRNA)</i>						
<i>Transfusion CH(ml)</i> <i>poner total</i>						
<i>Plasma(ml) poner</i> <i>total</i>						
<i>Plaquetas(ml) poner</i> <i>total</i>						
<i>Eventos adversos*</i>						

*Poner número según evento: 1. Isquemia coronaria 2. Daño miocárdico difuso 3.EAP
 4. Taquiarritmia 5. Reintervención por sangrado
 6. Reintervención por taponamiento 7. Fibrilación Auricular (FA)
 8. PCR 9. Fracaso renal agudo 10. Accidente cerebrovascular
 11. Exitus 12. Otros (indicar cual)

V3.1 (28-07-2017)

5. Resultados

No existieron diferencias significativas entre los datos epidemiológicos, riesgo preoperatorio del paciente, y número de puentes coronarios realizados entre los dos grupos (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los pacientes

	SS	PP
Sexo (M/F)	2/2	2/2
Edad (años)	64-74	61-72
Talla (cm)	156-170	164-171
EUROSCORE II	1.22%	1.43%
Clase ASA	III (II-IV)	III (II-IV)
Fración de eyección (%)	54%+/-8%	57%+/-7%
Número de bypass aortocoronarios (1,2 o 3)	2:1 3:3	2:2 3:2
Reconversion CPB	0	0
Tratamiento preoperatorio:		
Betabloqueantes	4	4
IECAs	4	4
Nitratos	4	4
Bloqueadores de los canales de calcio	0	1
Diuréticos	0	0
Broncodilatadores	1	1
AAS	4	4
Insulina	2	2

Tomado de. Jose Luis Guerrero Orriach, Juan Jose Escalona Belmonte, Marta Ramirez Aliaga, Alicia Ramirez Fernandez, Maria Jose Rodriguez Capitan, Guillermo Quesada Muñoz, Aida Raigón Ponferrada, Juan Alcaide Torres, Concepcion Santiago-Fernandez, Emilio Matute Gonzalez, Manuel Rubio Navarro, Rocio Bautista , Josefa Gómez Maldonado, Lourdes Garrido-Sanchez, Jose Cruz Mañas. NGS of microRNAs involved in cardioprotection induced by sevoflurane compared to propofol in myocardial revascularization surgery: The ACDHUVV-16 Clinical Trial. *Curr Med Chem.* 2020;27:1-12 doi: 10.2174/09298673279992010012026072020

Los datos se expresan en valores absolutos, medianas y rangos. ASA: *American Society of Anesthesiologists*. CPB: Bypass cardiopulmonar. SS: Sevoflurano intra y postoperatorio. PP: Propofol intra y postoperatorio.

La hemodinámica (frecuencia cardíaca, presión arterial, presión venosa central, índice cardíaco, índice de volumen sistólico, fracción de eyección del ventrículo izquierdo) y las enzimas miocárdicas (troponina I) se estudiaron en las primeras 48 horas (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros hemodinámicos y bioquímicos. Valores recogidos de manera previa a la esternotomía y 6, 12, 24 y 48 horas tras la cirugía de revascularización miocárdica. No se observaron diferencias entre los dos grupos en otros parámetros hemodinámicos o bioquímicos.

Datos expresados en media \pm SD

	SS basal	SS 6 H	SS 12 H	SS 24 h.	SS 48H	PP basal	SS 6 H	SS 12 H	PP 24 h.	PP 48 H
Frecuencia cardíaca lat/min	56 \pm 6	63 \pm 17	69 \pm 12	67 \pm 11	74 \pm 13	45 \pm 11	70 \pm 10	79 \pm 10	68 \pm 6	69 \pm 3
PAM mmHg	77 \pm 9	66 \pm 12	69 \pm 16	69 \pm 9	81 \pm 9	66 \pm 8	84 \pm 13	86 \pm 14	72 \pm 6	76 \pm 10
IC ml/min/m ²	2.5 \pm 0.3	2.5 \pm 0.2	2.6 \pm 0.3	2.5 \pm 0.1	2.4 \pm 0.3	2.5 \pm 0.2	2.5	2.1 \pm 0.3	2.5 \pm 0.5	2.3 \pm 0.1
SvO2 %	70 \pm 11	77 \pm 10	78 \pm 4	81 \pm 6	75 \pm 4	70 \pm 6	80 \pm 4	67 \pm 10	68 \pm 6	68 \pm 3
PVC mmHg	9/4	5 \pm 2	7 \pm 4	7 \pm 3	9 \pm 3	10 \pm 3	4 \pm 3	5 \pm 4	6 \pm 3	6 \pm 4
SVI Ml/m ²	54 \pm 4	46 \pm 12	42 \pm 7	38 \pm 10	30 \pm 9	52 \pm 6	43 \pm 7	27 \pm 6	35 \pm 6	29 \pm 3
NT-ProBNP pcg/mL	102 \pm 98	---	---	---	837 \pm 321	112 \pm 69	---	---	---	894 \pm 264
Troponina ng/mL	0	0.8 \pm 0.45	1.96 \pm 1.12	0.59 \pm 0.31	0.26 \pm 0.19	0	0.87 \pm 0.12	2.01 \pm 1.31	0.40 \pm 0.22	0.2 \pm 0.03

*p<0.05 (diferencia estadísticamente significativa). CPB: By-pass cardiopulmonar. SS: Sevoflurano intra y postoperatorio. PP: Propofol intra y postoperatorio.

PAM (presión arterial media), IC (índice cardíaco), SvO2 (saturación de oxígeno venosa mixta), PVC (presión venosa central), SVI (índice de volumen sistólico)

Tomado de. Jose Luis Guerrero Orriach, Juan Jose Escalona Belmonte, Marta Ramirez Aliaga, Alicia Ramirez Fernandez, Maria Jose Rodriguez Capitan, Guillermo Quesada Muñoz, Aida Raigón Ponferrada, Juan Alcaide Torres, Concepcion Santiago-Fernandez, Emilio Matute Gonzalez, Manuel Rubio Navarro, Rocio Bautista , Josefa Gómez Maldonado, Lourdes Garrido-Sanchez, Jose Cruz Mañas. NGS of microRNAs involved in cardioprotection induced by

sevoflurane compared to propofol in myocardial revascularization surgery: The ACDHUVV-16 Clinical Trial. *Curr Med Chem.* 2020;27:1-12 doi: 10.2174/09298673279992010012026072020

Las enzimas que se implican en los efectos beneficiosos se encontraron en mayor concentración en el grupo SS frente al grupo PP (Akt, TNF α , ERK 1/2, caspasa 3). Figuras 1 y 2.

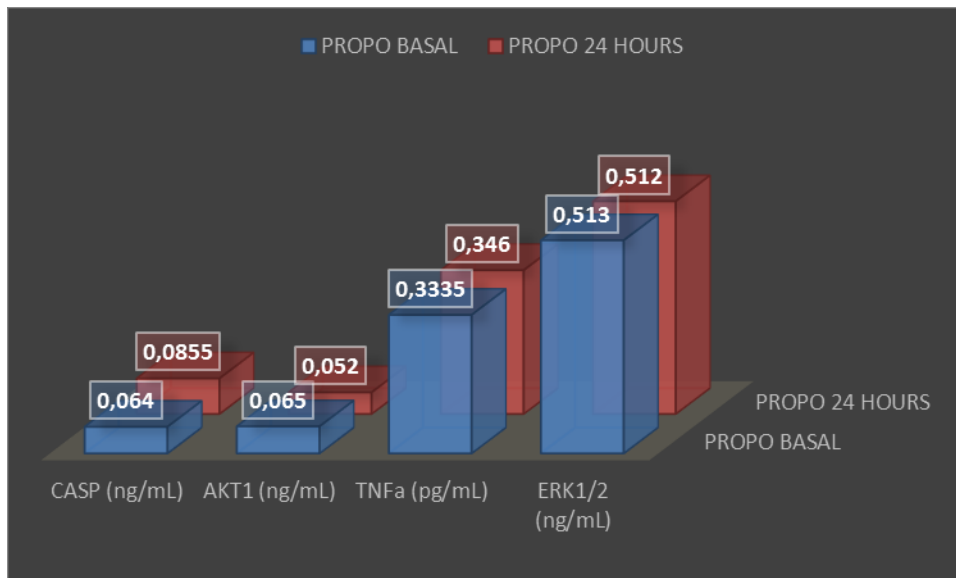


Figura 1. Concentración de enzimas implicadas en el pre y postcondicionamiento en el grupo PP.

Tomado de. Jose Luis Guerrero Orriach, Juan Jose Escalona Belmonte, Marta Ramirez Aliaga, Alicia Ramirez Fernandez, Maria Jose Rodriguez Capitan, Guillermo Quesada Muñoz, Aida Raigón Ponferrada, Juan Alcaide Torres, Concepcion Santiago-Fernandez, Emilio Matute Gonzalez, Manuel Rubio Navarro, Rocio Bautista , Josefa Gómez Maldonado, Lourdes Garrido-Sanchez, Jose Cruz Mañas. NGS of microRNAs involved in cardioprotection induced by sevoflurane compared to propofol in myocardial revascularization surgery: The ACDHUVV-16 Clinical Trial. *Curr Med Chem.* 2020;27:1-12 doi: 10.2174/09298673279992010012026072020

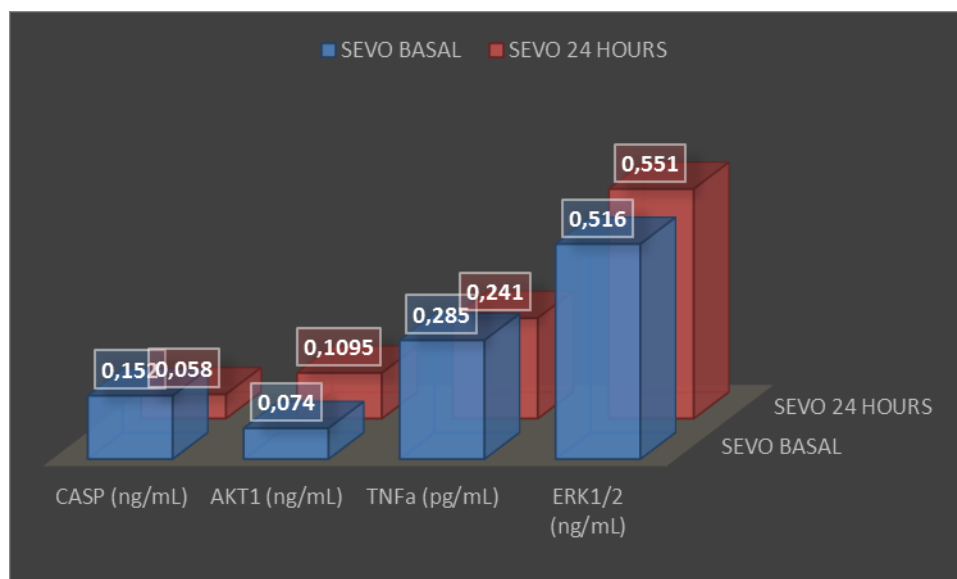


Figura 2. Concentración de enzimas implicadas en el pre y postcondicionamiento en el grupo SS. Las enzimas beneficiosas se encuentran elevadas tras la administración de este fármaco.

Tomado de. Jose Luis Guerrero Orriach, Juan Jose Escalona Belmonte, Marta Ramirez Aliaga, Alicia Ramirez Fernandez, Maria Jose Rodriguez Capitan, Guillermo Quesada Muñoz, Aida Raigón Ponferrada, Juan Alcaide Torres, Concepcion Santiago-Fernandez, Emilio Matute Gonzalez, Manuel Rubio Navarro, Rocio Bautista , Josefa Gómez Maldonado, Lourdes Garrido-Sanchez, Jose Cruz Mañas. NGS of microRNAs involved in cardioprotection induced by sevoflurane compared to propofol in myocardial revascularization surgery: The ACDHUVV-16 Clinical Trial. *Curr Med Chem.* 2020;27:1-12 doi: 10.2174/09298673279992010012026072020

Los análisis de sangre se llevaron a cabo en ocho pacientes (cuatro de cada grupo) en situación basal y a las 24 horas mediante NGS. Así, se analizaron 16 muestras. Posteriormente, un análisis qPCR de los miRNAs identificados mediante la secuenciación como significativos permitirá determinar aquellos con mayor relación con el acondicionamiento miocárdico inducidos por fármacos halogenados.

Se observaron diferencias significativas entre la situación basal y las 24 horas en los dos grupos del estudio. En el grupo PP el miRNAs 197-3p se sobreexpresó, mientras que la expresión de los miRNAs 4443, 708-3p y 1294 disminuyó. En el grupo SS, los miRNAs 615 3p, 4466, 29, 29, 937-3p, 636, 197-3p, 184, 4685, 296 3p, 147b, 3199, 6815 y 3176 disminuyeron mientras que el 708-3p se sobreexpresó. Posteriormente tras la realización de RT-qPCR se dieron como

variaciones cuantitativamente significativas finales en el grupo P los miRNAs 197-3p, 4443, 708-3p y 1294, y en el grupo S miRNAs 937-3p, 636, 197-3p, 296-3p y 708-3p. Figuras 3 y 4.

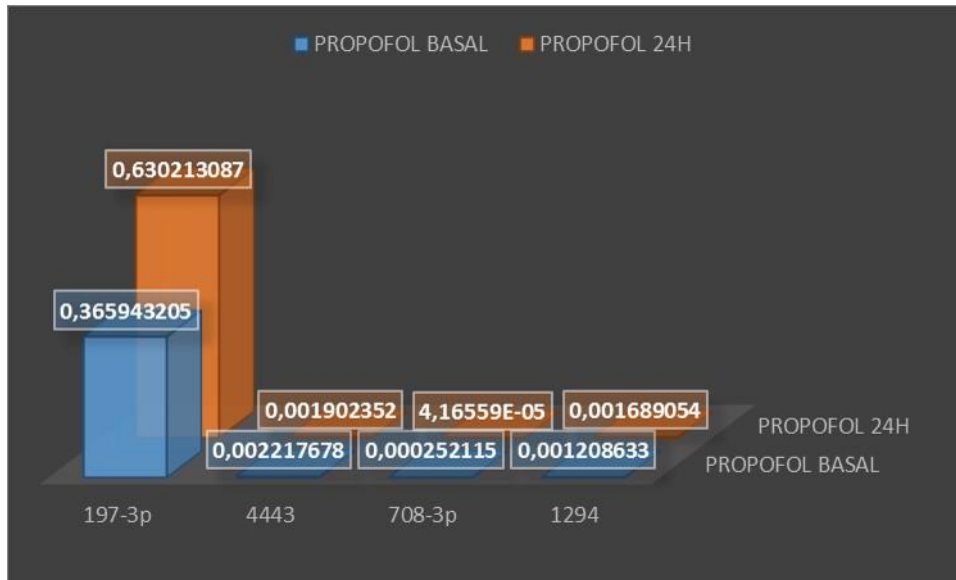


Figura 3. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el grupo PP entre la determinación basal y las 24 horas, se sobreexpresó el miRNAs 197-3p, mientras que disminuyó la expresión de los miRNAs 4443 and 1294, 708-3p.

Tomado de. Jose Luis Guerrero Orriach, Juan Jose Escalona Belmonte, Marta Ramirez Aliaga, Alicia Ramirez Fernandez, Maria Jose Rodriguez Capitan, Guillermo Quesada Muñoz, Aida Raigón Ponferrada, Juan Alcaide Torres, Concepcion Santiago-Fernandez, Emilio Matute Gonzalez, Manuel Rubio Navarro, Rocio Bautista , Josefa Gómez Maldonado, Lourdes Garrido-Sanchez, Jose Cruz Mañas. NGS of microRNAs involved in cardioprotection induced by sevoflurane compared to propofol in myocardial revascularization surgery: The ACDHUVV-16 Clinical Trial. *Curr Med Chem.* 2020;27:1-12 doi: 10.2174/09298673279992010012026072020

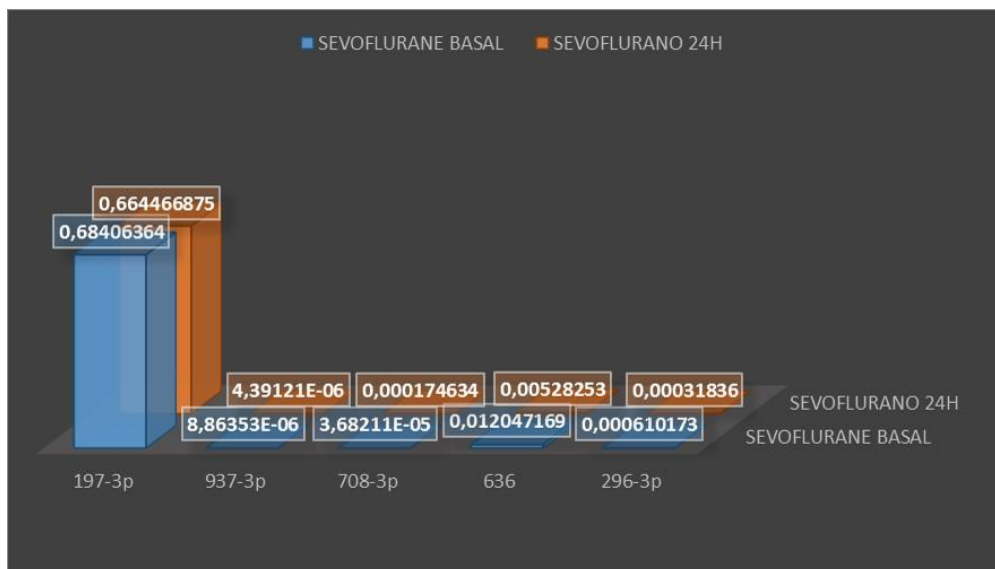


Figura 4. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el grupo SS entre la determinación basal y las 24 horas. Se sobreexpresó el miRNAs 708-3p, mientras que disminuyó la expresión de los miRNAs 937-3p, 636, 197 3p, 296 3p

Tomado de. Jose Luis Guerrero Orriach, Juan Jose Escalona Belmonte, Marta Ramirez Aliaga, Alicia Ramirez Fernandez, Maria Jose Rodriguez Capitan, Guillermo Quesada Muñoz, Aida Raigón Ponferrada, Juan Alcaide Torres, Concepcion Santiago-Fernandez, Emilio Matute Gonzalez, Manuel Rubio Navarro, Rocio Bautista, Josefa Gómez Maldonado, Lourdes Garrido-Sanchez, Jose Cruz Mañas. NGS of microRNAs involved in cardioprotection induced by sevoflurane compared to propofol in myocardial revascularization surgery: The ACDHUVV-16 Clinical Trial. *Curr Med Chem.* 2020;27:1-12 doi: 10.2174/09298673279992010012026072020

6. Discusión

Los pacientes intervenidos de cirugía de revascularización presentan una elevada morbimortalidad. Así, en el año 2011, un grupo de expertos se reunieron con la intención de definir las estrategias terapéuticas capaces de influir en la morbimortalidad de estos pacientes, entre las que incluyeron los fármacos anestésicos halogenados. Esto fue así ya que, según la tendencia de la evidencia científica, estos fármacos son capaces de conferir protección cardíaca y de otros órganos, influyendo en los resultados a corto (postoperatorio inmediato) y largo plazo. Además, la cirugía de revascularización miocárdica es un modelo adecuado para estudiar lo que ocurre en el paciente al aplicar estos fármacos halogenados ya que en este procedimiento, se produce de forma programada un episodio de isquemia-reperusión. (Fleisher LA et al, 2007) (Landoni et al, 2013).

Diversos estudios han puesto de manifiesto cómo el empleo de un anestésico halogenado frente a propofol, gracias a los mecanismos de acondicionamiento, es capaz de conferir a estos pacientes protección orgánica, fundamentalmente miocárdica, en forma de disminución de la lesión miocárdica, de menor necesidad de fármacos inotrópicos y de menor estancia en UCI. Estos estudios han reflejado el efecto farmacológico beneficioso de estos halogenados (desflurano, sevoflurano e isoflurano) cuando se emplean antes (precondicionamiento) y después (postcondicionamiento) de la isquemia en pacientes con cardiopatía isquémica en comparación con anestesia total intravenosa. (Landoni et al, 2013) (Bignami E et al, 2009) (De Hert et al 2006).

Además, se ha publicado que el efecto protector miocárdico, a través de menor liberación postoperatoria de troponina I y Nt-proBNP y menor estancia en UCI, es significativo cuando el anestésico volátil se administraba durante todo el procedimiento quirúrgico frente a la administración parcial en el mismo. (De Hert et al, 2008).

Diversos autores han estudiado diferentes patrones de administración del anestésico halogenado. Hellstrom lo administró en el postoperatorio comprándolo con propofol y demostrando menor niveles de troponina aunque sin diferencias significativas entre los grupos. Steurer hizo un estudio similar en el que encontró diferencias significativas con menor elevación de troponinas probablemente debido a un tiempo de uso de sevoflurano postoperatorio más prolongado. (Steurer et al, 2012) (Hellström J et al, 2011). Sin embargo, en los trabajos previos de este grupo de investigación, se comparó la administración de propofol y sevoflurano, prolongando el uso de cada uno de los fármacos desde el intraoperatorio hasta el momento de la extubación en el

postoperatorio tras seis horas de administración de cada fármaco. Además, se añadió un grupo control en el que se administró sevoflurano intraoperatoriamente y propofol en el postoperatorio. Las conclusiones de estos trabajos de este grupo de investigación fueron que el grupo Sevoflurano-Sevoflurano los pacientes mostraron menores niveles de biomarcadores como que los pacientes de los otros dos grupos y, además, en el grupo Sevoflurano- Propofol estos marcadores también variaron de manera significativa con respecto al grupo Propofol-Propofol. De esta forma, concluimos que el efecto cardioprotector del sevoflurano depende del momento y de la dosis de administración. (Guerrero J et al, 2013) (Guerrero J et al, 2013).

Con estos antecedentes, en este trabajo hemos evaluado las diferencias en cuanto a la expresión de miRNAs en los grupos en los que se ha administrado sevoflurano o propofol durante todo el proceso, tratando de explicar los mecanismos genéticos que subyacen a los mecanismos de acondicionamiento conseguidos por el sevoflurano y, continuando así con la línea de investigación de este grupo. De esta manera, encontramos diferencias en la expresión de diversos miRNAs entre ambos grupos que podrían explicar los cambios en la génesis de proteínas que forman parte de las rutas enzimáticas del acondicionamiento.

En nuestro trabajo hemos conseguido relacionar determinados miRNAs con los efectos de cardioprotección de los fármacos halogenados en comparación con los intravenosos, a través de una secuenciación completa en los dos grupos de pacientes. Los miRNAs responsables de este efecto, en nuestro estudio son, además, diferentes a los relacionados con el acondicionamiento isquémico.

La sobreexpresión de diferentes miRNAs en el grupo PP se asoció con un descenso en los niveles de enzimas asociadas con el pre y postcondicionamiento miocárdico y con mediadores de progresión de enfermedad ateromatosa. Por el contrario, en el grupo SS, las variaciones en miRNAs se relacionaron con la activación de mediadores del pre y postcondicionamiento anestésico y con disminución de la apoptosis celular y de las concentraciones de caspasas y TNF α . Además, los cambios en estos miRNAs se asociaron a mejor pronóstico en pacientes con cardiopatía isquémica y reducción en la incidencia de daño aterosclerótico.

En el grupo PP, la sobreexpresión el miRNA 197-3, relacionado con la modulación de las enzimas PI3K y AKT, provocando una inhibición de estas rutas proteicas, fundamentales en el preconditionamiento cardíaco. En este grupo disminuyó la expresión del miRNA 708-3p (cuya expresión aumenta en aquellos pacientes expuestos al grupo SS), lo que se asocia a una disminución de las kinasas Akt y JNK MAP, que resultan esenciales para el acondicionamiento miocárdico (McMannus et al, 2017) (Liu B et al, 2018).

Además, la exposición al propofol de este grupo, disminuyó la concentración de miRNA 4443, con disminución consecuente de las enzimas JAK2/STAT3, también implicadas en la protección farmacológica miocárdica (Fattore L et al, 2019). El miRNA 1275, disminuyó de manera similar al 4443, y está implicado en la iniciación del proceso molecular por el que se produce la protección cardíaca actuando a través de la mitocondria. Este miRNA actuando a través de los productos liberados tras la ruptura del ATP (AMP, adenosina e inosina monofosfato) activa la AMPK, generando un estado hipometabólico que juega un papel fundamental en el preconditionamiento isquémico, a través de la preservación mitocondrial y de los KATP. Estos dos últimos puntos, son los principales responsables de la supervivencia celular miocárdica por los mecanismos de acondicionamiento farmacológico cardíaco. Así concluimos que la disminución en la expresión de los miRNAs relacionados con vías de acondicionamiento miocárdico, inhibirán las rutas enzimáticas relacionadas con el mismo. (Gottlieb R et al, 2016) (Huan T et al, 2015).

Los hallazgos en el grupo de sevoflurano fueron sustancialmente diferentes, disminuyendo la expresión de los miRNAs 615 3p, 4466, 29, 937-3p, 636, 197-3p, 184, 4685, 2963p, 147b, 3199, 1294, 6815 y 3176, mientras que la del 708-3p aumentó. La qPCR sólo confirmó esta variación en los miRNAs 937-3p, 636, 197-3p, 296-3p y 708-3p.

La modulación en la expresión de los miRNAs 4466, 29, 4685, 184, 1294, 615-3p, 147b, 6815y 3176, aunque no confirmados en el análisis por qPCR, se relacionan con efectos cardioprotectores a través de su papel en las distintas rutas del pre y postcondicionamiento. (Sondermeijer BM et al, 2011) (Weber NC et al, 2006) (Liu B et al, 2018) (Pan W et al, 2019). (Heid J et al, 2017) (Chen Z et al, 2018) (Liu X et al, 2016) (Persson H et al, 2011) (Bautista et al, 2009) (Bronze-da-Rocha E 2014) (Yang B et al, 2008) (Li J et al, 2016).

La sobreexpresión del miRNA 708-3p en los pacientes expuesto al sevoflurano induce una regulación al alza de la Akt y la kinasa JNK MAP (Taniguchi T 2013).

El descenso en la expresión del miRNA 937 3p a las 24 horas en los análisis de nuestro estudio parece estar relacionado con un aumento en los niveles de PI3K/Akt ya que estos se inhiben con el aumento de este miRNA (Yang B et al, 2008). También se ha publicado datos que relacionan el descenso del miRNA 636 con la disminución del daño miocárdico secundario a infarto agudo de miocardio. (Schulte C et al, 2015).

Los miRNAs 296 3p y 3199 están implicados en la modulación del NF- κ B que se relaciona con la respuesta celular a estímulos como el estrés, tiene capacidad para inhibir la respuesta STAT y, en determinados escenarios, favorece la apoptosis celular. Así, el descenso de NF- κ B, podría

crear un ambiente favorable para la activación de los mecanismos de acondicionamiento miocárdico (Bautista L et al 2009).

De las diferentes variaciones de miRNAs en nuestro estudio, la que se dio de manera más importante es la del miRNA-197-3p. La sobreexpresión de este miRNA se ha relacionado en estudios previos, con situaciones de isquemia coronario; produciendo una elevación significativa en situaciones de isquemia miocárdica, independientemente del área afectada, ventrículo derecho o izquierdo; por lo que se ha planteado como marcador útil en este escenario clínico (cardiopatía isquémica). El miRNA 197 impulsa la activación plaquetaria, y se ha llegado a asociar con factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad coronaria, como son la dislipemia, y el síndrome metabólico; además de haberse asociado a la enfermedad cardiometabólica de manera importante. En situaciones de hipoxia tisular y de falta de riego coronario, existe elevación de este miRNA en el miocardiocito, formando parte de un grupo de miRNAs denominados hipoxiamiR, los cuales también se han involucrado en el desarrollo de la patología isquémica cardíaca [11, 15, 20-25] [11, 20]. (Guerrero et al, 2017) (Fattore et al, 2019) (Heid J et al, 2017) (Pan W et al, 2019) (Yang B et al, 2008) (Schulte C et al, 2015) (Chen Z et al, 2018) (Liu X et al, 2016)

Además, un trabajo reciente relacionó los niveles elevados plasmáticos de este miRNA con un aumento de la mortalidad debida a síndrome coronario agudo, lo que lo hace como uno de los marcadores de mayor utilidad como herramienta de diagnóstica, pronóstica y terapéutica en pacientes con cardiopatía isquémica (Schulte C et L, 2015)

En nuestro trabajo se evidenció cómo se produjo el ascenso en las concentraciones de miRNA 197 3p tras la exposición a propofol a diferencia de lo que sucedió cuando se trató a los pacientes con sevoflurano. Este hallazgo creemos que, probablemente y en nuestra opinión, es el de mayor relevancia de nuestro estudio. Es probable que gran parte del beneficio clínico alcanzado por el sevoflurano en el perioperatorio de cirugía de revascularización miocárdica, en pacientes con enfermedad coronaria, esté en relación con la variación producida en este miRNA.

Posteriormente relacionamos nuestros resultados a través de la aplicación www.minitargets.com, con los distintos genes que pueden ser afectados por los efectos sobre los miRNAs evidenciados en nuestro trabajo; si bien, no fueron determinados de manera directa durante el estudio, podrían ser los receptores finales de la secuencia en la modulación génica producida por los distintos hipnóticos (tabla 3). En nuestra opinión, nuevos trabajos deben demostrar si la relación descrita es consistente con nuestros hallazgos.

	<i>miRNA 197-3p</i>	<i>miRNA 708-3P</i>	<i>miRNA 4443</i>	<i>miRNA 1294</i>	<i>miRNA 937-3p</i>	<i>miRNA 636</i>	<i>miRNA 296-3p</i>
TARGET GENES	<i>PIK3R5, F730038I5Rik, FOAP-2, P101-PI3K and p101</i>	<i>MAPK1, ERK, ERK – 2, ERK2, ERT1, MAPK2, P42MAPK, PRKM1, PRKM2, p38, p40, p41, p41mapk, p42-MAPK</i>	<i>IFNAR1, AVP, IFN – alpha – REC, IFNAR, IFNBR, IFRC for miRNA 4443, and CSF3R, CD114, GCSFR</i>	<i>SCN7</i>	<i>NOS1</i>	<i>AKT3, MPPH, MPPH2, PKB-GAMMA, PKBG, PRKBG, RAC – PK – gamma, RAC – gamma, STK - 2.</i>	<i>CCND1, BCL1, D11S287E, PRAD1, U21B31</i>

Tabla 3. Los genes objetivo de los específicos miRNAs se pueden detectar usando RNAm.

Tomado de. Jose Luis Guerrero Orriach, Juan Jose Escalona Belmonte, Marta Ramirez Aliaga, Alicia Ramirez Fernandez, Maria Jose Rodriguez Capitan, Guillermo Quesada Muñoz, Aida Raigón Ponferrada, Juan Alcaide Torres, Concepcion Santiago-Fernandez, Emilio Matute Gonzalez, Manuel Rubio Navarro, Rocio Bautista , Josefa Gómez Maldonado, Lourdes Garrido-Sanchez, Jose Cruz Mañas. NGS of microRNAs involved in cardioprotection induced by sevoflurane compared to propofol in myocardial revascularization surgery: The ACDHUVV-16 Clinical Trial. *Curr Med Chem.*2020;27:1-12 doi: 10.2174/09298673279992010012026072020

Como hemos descrito previamente, el efecto que sobre la expresión del miRNA 197-3p tienen ambos fármacos estudiados en este ensayo es contrario y, el efecto obtenido finalmente es una regulación al alza o a la baja de enzimas fuertemente relacionadas con el acondicionamiento, la PI3K y AKT, conseguida a través del efecto inhibitor o facilitador sobre los genes PIK3R5, F730038I5Rik, FOAP-2, P101-PI3K y p101.

En nuestra opinión existen diversos puntos fundamentales a destacar en nuestro estudio; en primer lugar, la técnica realizada es la secuenciación de miRNAs, a diferencia de otros trabajos

en los que se utilizaron arrays para hallar los niveles de determinados paneles de miRNAs relacionados con la patología cardíaca, esto hace que nuestros hallazgos sean distintos a los que se habrían obtenido con esta técnica. Varios de los miRNAs descritos, son conocidos a través de su papel en otras patologías distintas a la cardíaca, y muchos de ellos ni siquiera se han relacionado con el pre o postcondicionamiento isquémico; sin embargo, las rutas proteicas moduladas por los mismos coinciden con las que se responsabilizan del acondicionamiento miocárdico por halogenados, tras su exposición prolongada en el intra y postoperatorio inmediato, a diferencia del propofol. Describimos por primera vez, cuales son los miRNAs que se modulan tras la exposición al propofol y al sevoflurano en pacientes con cardiopatía isquémica que son intervenidos de revascularización miocárdica sin circulación extracorpórea.

Por otra parte, nuestros hallazgos confirman que las diferencias encontradas habitualmente entre grupos de tratamiento, no se basa únicamente en un efecto de modulación beneficiosa de la expresión génica en pacientes anestesiados con sevoflurano y sedados en el postoperatorio con este fármaco, sino en el papel del propofol sobre distintos miRNAs que provocan una disminución de los mediadores enzimáticos del acondicionamiento miocárdico.

Nuestros primeros resultados en la primera fase del ensayo clínico plantea la posibilidad de que la modulación génica sea diferente dependiendo del fármaco hipnótico usado, y de esto dependa en mayor o menor medida los mecanismos de protección cardíaca de los anestésicos halogenados; el efecto beneficioso aportado por el acondicionamiento farmacológico con sevoflurano no debería cuestionarse, aunque sí la repercusión real de este beneficio, motivo de múltiples trabajos y metaanálisis, que alcanzaron distintas conclusiones. Por otra parte el uso del propofol realiza un movimiento en las concentraciones de distintos miRNAs, con los que se aboliría gran parte de los mecanismos destinados a minimizar el daño cardíaco en situaciones de isquemia.

6.1. Limitaciones del estudio

- Es un estudio realizado en un único centro lo que implica posibilidad de sesgos y dificultad a la hora de extrapolar los datos ya que actúa sobre un ámbito local concreto. Esta limitación queda minimizada al comparar los datos basales de nuestra población con otras publicadas en la literatura y resultar similares y además, al calcular un tamaño muestral suficiente para garantizar los hallazgos estadísticos. La ventaja de realizar este estudio con estas condiciones, es la posibilidad de realizarlo en pacientes intervenidos sin necesidad de circulación extracorpórea por parte de cirujanos expertos en esta técnica.
- Los pacientes fueron asignados a los distintos grupos al azar previamente al quirófano, sin embargo, las características de los fármacos empleados impidió el ciego del estudio ya que implican diferentes métodos de administración, intravenosa mediante un sistema de bomba el propofol y a través de vaporizadores el sevoflurano. A pesar de esto y para minimizar esta limitación y asegurar la calidad de los hallazgos, el análisis sí se realizó “cegando” los datos, ya que el analizador sólo conocía los grupos pero no el tratamiento asignado a cada uno.
- La necesidad de analizar la concentración de estos miRNAs, responsables posiblemente del acondicionamiento farmacológico en un número de pacientes mayor; lo que será la segunda parte de este ensayo clínico. En el planteamiento inicial de este ensayo clínico se calcula el tamaño muestral necesario para extraer diferencias significativas de los objetivos del ensayo, sin embargo, la enorme dificultad técnica y el coste de la técnica de secuenciación, nos obligaron a plantear este primer desarrollo del y, posteriormente con la conclusiones de este trabajo, completar el ensayo de acuerdo al tamaño muestral calculado.
- Justificación del tamaño muestral del ensayo ACDHUVV-16.
Describimos a continuación la justificación del tamaño muestral del ensayo completo con el que se pretende alcanzar significación estadística, aunque esta tesis sólo alcanza los cuatro primeros pacientes de cada brazo de estudio, en base a la dificultad de realización de la técnica en nuestro ámbito y las limitaciones económicas de este estudio, siguiendo como guía lo realizado en otros estudios de la literatura. Considerando que una variación del 5% sería clínicamente relevante, para detectar cambios en la codificación genética, a través de los microRNA y, teniendo en cuenta que, por estudios previos podríamos concluir que para mRNA 92, su expresión presenta una media de 0.4 con una desviación típica de 0.1 aproximadamente, podemos concluir que:

Para conseguir una potencia del 80,0% para detectar diferencias en el contraste de la hipótesis nula $H_0: \mu_1 = \mu_2$ mediante una Prueba T-Student bilateral para dos muestras independientes, teniendo en cuenta que el nivel de significación es del 5% y, asumiendo que la media del grupo de Referencia es de 0,35 unidades, la media del grupo Experimental es de 0,40 unidades y la desviación típica de ambos grupos es de 0,10 unidades, será necesario incluir 64 unidades experimentales en el grupo de Referencia y 64 unidades en el grupo Experimental, totalizando 128 unidades experimentales en el estudio.

6.2. Posibilidades de futuro

- El conocimiento de la expresión de miRNAs en estos pacientes podría servirnos para generar en el futuro biomarcadores que permitieran clasificar estos pacientes según el riesgo quirúrgico o el pronóstico.
- El conocimiento de los miRNAs que confieren acondicionamiento o protección miocárdica permitiría generar de nuevas terapias basadas en modulación génica para el tratamiento y prevención del daño cardíaco.

7. Conclusiones

- Los resultados de la secuenciación detectan una variación en la expresión de miRNAs relacionados con el acondicionamiento farmacológico con halogenados, que son diferentes de aquellos publicados en otros trabajos relacionados con el pre y postcondicionamiento isquémico. De esta forma, se resalta la utilidad de la secuenciación NGS frente al uso de arrays con patrones de miRNAs ya conocidos.
- El empleo de propofol como hipnótico de forma continuada durante el intra y el postoperatorio de estos pacientes determina un cambio en la expresión génica de miRNAs que conllevan una disminución en la expresión de enzimas relacionadas con el pre y postcondicionamiento como las del grupo STAT o la enzima MAPK.
- El uso de sevoflurano como hipnótico de manera continuada tanto durante el intraoperatorio como en el postoperatorio de estos pacientes, conlleva un cambio en la expresión génica relacionado con los miRNAs que consigue la activación de enzimas mediadoras del pre y postcondicionamiento anestésico como AKT, ERK, vías PI3K/Akt y enzimas del grupo STAT, destacando el papel del miRNA 197-3p.

8. Diccionario de siglas

AIF: factor inductor de la apoptosis

AnaConDa (*Anaesthetic Conserving Device*): dispositivo de conservación de gases anestésicos

ANOVA: Análisis de la varianza

ASA: Sociedad americana de anestesia

ATP: adenosina trifosfato celular

BIS: índice biespectral

BNP: péptido natriurético cerebral

CAM: concentración alveolar mínima

Casp9: gen de la caspasa relacionado con la apoptosis

CEC: circulación extracorpórea

CPK-MB: fracción sérica de la creatín fosfoquinasa

CRD: cuaderno de recogida de datos

DAG: diacilglicerol

EB: exceso de bases

EPOC: enfermedad obstructiva crónica

EUROSCORE (*European System for cardiac operative Risk Evaluation*): Sistema europeo para la evaluación del riesgo cardiaco operatorio

FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo

GABA: ácido γ aminobutírico

Grupo SS: grupo de pacientes a los que se administró sevoflurano en el intra y en el postoperatorio

Grupo PP: grupo de pacientes a los que se administró propofol en el intra y en el postoperatorio

Grupo SP: grupo de pacientes a los que se administró sevoflurano en el intra y propofol en el postoperatorio

GSK3beta: Kinasa 3β Glicógeno Sintetasa

H9C2: tipo de células de corazón embrionario de rata

IC: índice cardíaco

IL: interleukina

IP3: inositol trifosfato

IP3 K/ Akt: Fosfatidilinositol Trifosfato Kinasa

IR: isquemia-reperfusión

KATP: canales de K⁺ dependientes de ATP
IMM: membrana mitocondrial interna
MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEK /ERK1/2: Proteín Kinasa regulada extracelularmente ½
miRNA: microRNA
mPTP: poros de permeabilidad transitoria mitocondrial
NCBI (*National Center for Biotechnology Information*): Centro nacional para la Información Biotecnológica
NGS (*Next-generation sequencing*): Secuenciación de nueva generación
NF-KB: factor de transcripción nuclear B
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintasa
NT-proBNP: fracción aminoterminal del pro péptido BNP
p70s6 K: 70 kDa protein-kinasa S6 ribosomal
PAB: Plataforma Andaluza de Bioinformática
PaCO₂: presión arterial de dióxido carbónico
PAD: presión arterial diastólica
PAM: presión arterial media.
PaO₂: presión arterial de oxígeno
PAS: presión arterial sistólica
PCR: Proteína C reactiva
PDCD4: proteína de muerte celular programada 4
PI: fósforo inorgánico
PKC: proteinquinasa C
PNTs: procedimientos normalizados de trabajo
PTEN: fofatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa
PVC: presión venosa central
qPCR: PCR cuantitativa
RISC (*RNA-Induced Silencing Complexes*): complejos de silenciamiento inducidos por ARN.
RISK (*Reperfusion Injury salvage Kinase*) Pathway: vías antiapoptóticas ligadas a caspasas
ROS: especies reactivas de oxígeno
SAFE: *Survivor Activating Factor Enhancement*
SEMICYUC: Sociedad española de medicina intensiva, crítica y de unidades coronarias.
SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
STAT-3: *signal transducer and activator of transcription -3*
SVI: Índice de volume sistólico
SvO₂: saturación de oxígeno venosa mixta

TCI (*target-controlled infusión*): infusión controlada por objetivo

TIVA: anestesia total intravenosa

TnC: troponina C

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

TNF α R1: Receptor del factor de necrosis tumoral alfa

TnI: troponina I

TnT: troponina T

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

9. Bibliografía

1. Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, Zoga E, Walther S, Kasseckert S, et al. Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2005;66:123-31
2. Baars T, Skyschally A, Klein-Hitpass L, Cario E, Erbel R, Heusch G, Kleinbongard P. microRNA expression and its potential role in cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs. *Pflugers Arch.* 2014 Oct;466(10):1953-61. doi: 10.1007/s00424-013-1429-3.
3. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 2008;455:64–71
4. Balakumar P, Rohilla A, Singh M: Pre-conditioning and postconditioning to limit ischemiareperfusion myocardial injury: what could be the next footstep? *Pharmacol Res.* 2008; 57: 403412
5. Ballester M, Llorens J, García de la Asunción J et al. Myocardial oxidative stress protection by sevoflurane vs. propofol: a randomized controlled study in patients undergoing off pump coronary artery bypass graft surgery. *European Journal of Anaesthesiology.* 2011; 28:874-81
6. Barrabés JA, Mirabet M, Agulló L, Figueras J, Pizcueta P, García-Dorado D. Platelet deposition in remote cardiac regions after coronary occlusion. *Eur J Clin Invest.* 2007; 37: 939-46
7. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215–233
8. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.*

9. Bautista L1, Castro MJ, López-Barneo J, Castellano A. Hypoxia inducible factor-2alpha stabilization and maxi-K+ channel beta1-subunit gene repression by hypoxia in cardiac myocytes: role in preconditioning. *Circ Res.* 2009 Jun 19;104(12):1364-72.
10. Beck-Schimmer B, Breitenstein S, Urech S, De Conno E, Wittlinger M, Puhan M, Jochum W, Spahn DR, Graf R, Clavien PA. A randomized Controlled Trial on Pharmacological Preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic. *Ann Surg.* 2008;248(6):909-918.
11. Belhomme D, Peynet J, Louzy M, Launay JM, Kitakaze M, and Menasche P. Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 1999; 100: II340–344
12. Bignami E, Landoni G, Crescenzi G, Gonfalini M, Bruno G, Pappalardo F, Marino G, Zangrillo A, Alfieri O. Role of cardiac biomarkers (troponin I and CK-MB) as predictors of quality of life and long-term outcome after cardiac surgery. *Ann Card Anaesth.* 2009;12:22-6
13. Bland JH, Lowenstein E. Halothane-induced decrease in experimental myocardial ischemia in non-failing canine heart. *Anesthesiology.* 1976; 45: 287-293.
14. Bonnefoy E, Filley S, Kirkorian G, Guidollet J, Roriz R, Robin J, Touboul P. Troponin I, troponin T, or creatine kinase-MB to detect perioperative myocardial damage after coronary artery bypass surgery. *Chest.* 1998;114(2):482-6
15. Boon RA, Dimmeler S. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12:135–142.
16. Bosnjak ZJ. Anesthetics and cardioprotection. *Signa Vitae.* 2007; 2 Suppl 1:S6-10
17. Bronze-da-Rocha E. MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases. *Biomed Res Int.* 2014;2014:985408.
18. Brown JR, Hernandez FJ, Klemperer JD, Clough RA, DiPierro FV, Hofmaster PA, Ross CS, O'Connor GT. Cardiac troponin T levels in on- and off-pump coronary bypass surgery. *Heart Surg Forum.* 2007;10(1):E42-6.
19. Bucher EA, Maisonpierre PC, Konieczny SF, Emerson CP. Expression of the troponin complex genes: transcriptional coactivation during myoblast differentiation and independent control in heart and skeletal muscles. *Moll Cell Biol.* 1988;8(4):134-142
20. Butterworth J, MackeyD, Wasnick J. *Anestesiología clínica de Morgan y Mikhail.* 5a ed. México: Manual Moderno; 2014
21. Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF: Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology.* 1997; 87: 1182-1190.

22. Chassot PG, van der Linden P, Zaugg M, Mueller XM, Spahn DR. Off-pump coronary artery bypass surgery: physiology and anaesthetic management. *Br J Anaesth.* 2004; 92(3):400-13.
23. Chen LJ, Lim SH, Yeh YT, Lien SC, Chiu JJ. Roles of microRNAs in atherosclerosis and restenosis. *J Boimed Sci.* 2012;19:79
24. Chen Z, Li C, Lin K, Zhang Q, Chen Y, Rao L. MicroRNAs in acute myocardialinfarction : Evident value as novel biomarkers? *Anatol J Cardiol.* 2018;19(2):140-147.
25. Cheng Y, Zhang C. MicroRNA-21 in cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010;3:251-5
26. Corcoran TB, Engel A, Sakamoto H, O'Callaghan-Enright S, O'Donnell A, Heffron JA, Shorten G. The effects of propofol on lipid peroxidation and inflammatory response in elective coronary artery bypass grafting. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2004;18(5):592-604.
27. Cozen PF, Fisher S, Detter C, Peter K. Sevoflurane provides greater protection of the myocardium than Propofol in patients undergoing off-pump coronary artery bypass. *Anesthesiology.* 2003; 99:826-833.
28. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341 (Pt 2): 233-249
29. Cuthbertson BH, Croal BL, Rae D, Gibson PH, McNeilly JD, Jeffrey RR, Smith WC, Prescott GJ, Buchan KG, El-Shafei H, Gibson GA, Hillis GS. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels and early outcome after cardiac surgery: a prospective cohort study. *Br J Anaesth.* 2009;103(5):647-53
30. Danielson LS, Park DS, Rotllan N, Chamorro-Jorganes A, Guijarro MV, Fernandez-Hernando C, Fishman GI, Phoon CK, Hernando E. Cardiovascular dysregulation of miR-17-92 causes a lethal hypertrophic cardiomyopathy and arrhythmogenesis. *FASEB J.* 2013;27:1460–1467.
31. De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, Nelis A, Van Reeth V, ten Broecke PW, De Blier IG, Stockman BA, Rodrigus IE. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology.* 2004; 101:299-310.
32. De Hert SG, Cromheecke S, ten Broecke PW, Mertens E, De Blier IG, Stockman BA, Rodrigus IE, Van der Linden PJ. Effects of Propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients. *Anesthesiology.* 2003;99(2):314-23.

33. De Hert SG, ten Broecke PW, Mertens E, Van Sommeren EW, De Blier IG, Stockman BA, Rodrigus IE. Sevoflurane but not Propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. *Anesthesiology*. 2002;97(1):42-49.
34. De Hert SG, Turani F, Mathur S, Stowe DF. Cardioprotection with volatile anesthetics: mechanisms and clinical implications. *Anesth Analg*. 2005;100(6):1584-93.
35. De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, ten Broecke PW, De Blier IG, Stockman BA, Rodrigus IE. Choice of primary anesthetic regimen can influence intensive care unit length of stay after coronary surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology*. 2004; 101(1):9-20.
36. De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, Nelis A, Van Reeth V, ten Broecke PW, De Blier IG, Stockman BA, Rodrigus IE. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology*. 2004;101:299-310.
37. De Hert SG. Cardioprotection in anesthesia. *Minerva Anesthesiol*. 2008; 74: 259-70.
38. De Hert SG. Cardioprotection with volatile anesthetics: clinical relevance. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2004; 17:57-62.
39. De Hert SG. The concept of anaesthetic-induced cardioprotection: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2005;19: 445-59.
40. De Hert SG. Volatile anesthetics and cardiac function. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2006;10:33-42.
41. Di Lisa F, Canton M, Carpi A, Kaludercic N, Menabò R, Menazza S, Semenzato M. Mitochondrial injury and protection in ischemic pre- and postconditioning. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 881-891
42. Diegeler A, Börgermann J, Kappert U, Breuer M, Böning A, Ursulescu A, Rastan A, Holzhey D, Treede H, Rieß FC, Veeckmann P, Asfoor A, Reents W, Zacher M, Hilker M; GOPCABE Study Group. Off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting in elderly patients. *N Engl J Med*. 2013;368:1189-98
43. Duchon MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 2000; 529 Pt 1: 57-68
44. Eisenhardt SU, Weiss JB, Smolka C, et al. MicroRNA-155 aggravates ischemia-reperfusion injury by modulation of inflammatory cell recruitment and the respiratory oxidative burst. *Basic Res Cardiol*. 2015;110:32.
45. El Azab SR, Rosseel PM, De Lange JJ, Groeneveld AB, Van Strik R, Van Wijk EM, Scheffer GJ. Effect of sevoflurane on the ex vivo secretion of TNF-alpha during and after coronary artery bypass surgery. *Eur J Anaesthesiol*. 2003;20(5):380-384.

46. Eliadsdottir SB, Klemenzson G, Torfason B, Valsson F. Brain natriuretic peptide is a good predictor for outcome in cardiac surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2008; 52:182-187
47. Fanjca F, Silver BS, Myles PS. Is fast-track cardiac anesthesia now the global standard of care?. *Anesth Analg*. 2009; 108 (3):689-91. [En línea]. [Consulta: 30 agosto 2015]. URL disponible en: <http://hinari-gw.who.int/whalecom>. www.anesthesi-analgesia.org.
48. Fattore L, Ruggiero CF, Pisanu ME, Liguoro D, Cerri A, Costantini S, Capone F, Acunzo M, Romano G, Mallardo D, Ragone C, Carriero MV, Budillon A, Botti G, Ascierio PA, Mancini R, Ciliberto G. Reprogramming miRNAs global expression orchestrates development of drug resistance in BRAF mutated melanoma. *Cell Death Differ*. 2019 ;26(7):1267-1282
49. Fleisher LA, Beckman JA, Brown KA, Calkins H, Chaikof E, Fleischmann KE, Freeman WK, Froehlich JB, Kasper EK, Kersten JR, Riegel B, Robb JF, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Lytle BW, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Tarkington LG, Yancy CW; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation for Noncardiac Surgery); American Society of Echocardiography; American Society of Nuclear Cardiology; Heart Rhythm Society; Society of Cardiovascular Anesthesiologists; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society for Vascular Medicine and Biology; Society for Vascular Surgery. ACC/AHA 2007 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation and Care for Noncardiac Surgery: Executive Summary. A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation for Noncardiac Surgery). *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1707-32.
50. Frey UH, Klaasen M, Ochsenfarth C, Murke F, Thielmann M, Kottenberg E et al. Remote ischaemic preconditioning increases serum extracellular vesicle concentrations with altered micro-RNA signature in CABG patients. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2019; 63(4):483-492
51. Fox AA, Muehlschlegel JD, Body SC, Shernan SK, Liu KY, Perry TE et al. Comparison of the utility of preoperative versus postoperative B-type natriuretic peptide for predicting hospital length of stay and mortality after primary coronary artery bypass grafting. *Anesthesiology*. 2010;112:842-51.

52. García-Dorado D, Théroux P, Munoz R, Alonso J, Elizaga J, Fernandez-Avilés F, et al. Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size. *Am J Physiol.* 1992;262:H17-22.
53. Glass C, Singla DK. MicroRNA-1 transfected embryonic stem cells enhance cardiac myocyte differentiation and inhibit apoptosis by modulating the PTEN/Akt pathway in the infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 301: H2038-49.
54. Gottlieb R, Pourpirali S. Lost in Translation: miRNAs and mRNAs in Ischemic Preconditioning and Ischemia/Reperfusion Injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2016 ; 95: 70–77.
55. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305: 626-629
56. Guarracino F, Landoni G, Tritapepe L, Pompei F, Leoni A, Aletti G, Scandroglio AM, Maselli D, De Luca M, Marchetti C, Crescenzi G, Zangrillo A. Myocardial damage prevented by volatile anesthetics: a multicenter randomized controlled study. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2006; 20(4):477-83
57. Guerin V, Ayed SB, Varnous S, Golmard JL, Leprince P, Beaudoux JL, Gandjbakhch I, Bernard M. Release of Brain Natriuretic-Related Peptides (BNP, NT-proBNP) and Cardiac Troponins (cTnT, cTnI) in On-pump and Off-pump Coronary Artery Bypass. *Surg Today.* 2006;36:783-789.
58. Guerrero JL, Galan M, Ariza D, Feal J, Rubio M, Cruz J. Treatment with sevoflurane sedation in astmatic crisis. *Br J Anaesth.* 2011 Jun. Disponible en: http://bj.oxfordjournals.org/forum/topic/brjana_el%3B7500.
59. Guerrero Orriach JL, Galán Ortega M, Ramirez Aliaga M, et al. Prolonged sevoflurane administration in the off-pump coronary artery bypass graft surgery: beneficial effects. *J Crit Care.* 2013 Oct;28(5):879.e13-8.
60. Guerrero Orriach JL, Ramirez Aliaga M, Galan Ortega M, Rubio Navarro M, Navarro Arce and Cruz Mañas J. Sevoflurane in Intraoperative and Postoperative Cardiac Surgery Patients. Our Experience in Intensive Care Unit with Sevoflurane Sedation. *Current Pharmaceutical Design,* 2013, 19, 3996-4002
61. Guerrero Orriach JL, Galan Ortega M, Ramírez Aliaga M, Ramirez Fernandez A, Moreno MI, Ariza D, et al. Cardioprotective efficacy of sevoflurane vs. propofol during induction and/or maintenance in patients undergoing coronary artery revascularization surgery without pump: A randomized trial. *Int J Cardiol.* 2017 15; 243:73-80
62. Guerrero Orriach JL, Escalona Belmonte JJ, Ramirez Aliaga M, Ramirez Fernandez A, Raigón Ponferrada A, Rubio Navarro M, Cruz Mañas J. Anesthetic-induced Myocardial Conditioning: Molecular Fundamentals and Scope. *Curr Med Chem* 2020;27(13):2147-2160. doi: 10.2174/0929867325666180926161427

63. Guerrero Orriach JL, Escalona Belmonte JJ, Ramirez Aliaga M, Ramirez Fernandez A, Rodriguez Capitan MJ, Quesada Muñoz G, Raigón Ponferrada A, Alcaide Torres J, Santiago-Fernandez C, Matute Gonzalez E, Rubio Navarro M, Bautista R, Gómez Maldonado J, Garrido-Sanchez L, Cruz Mañas J. NGS of microRNAs involved in cardioprotection induced by sevoflurane compared to propofol in myocardial revascularization surgery: The ACDHUVV-16 Clinical Trial. *Curr Med Chem.* 2020;27:1-12 doi: 10.2174/0929867327999201001202607
64. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 2010;466:835–840
65. Halestrap AP, Brennerb C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem.* 2003;10:1507-25.
66. Halestrap AP, Pasdois P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochem Biophys Acta* 2009; 1787: 1402-1415
67. Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, Wang NP, Kin H, Payne CS, Sun HY, Guyton RA, VintenJohansen J, Zhao ZQ. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg.* 2004;78:961-969
68. Hanouz JL, Yvon A, Massetti M, Lepage O, Babatasi G, Khayat A, Bricard H, Gerard JL. Mechanisms of desflurane- induced preconditioning in isolated human tight atria in vitro. *Anesthesiology.* 2002; 97:33-41
69. Hattler B, Messenger JC, Shroyer AL, Collins JF, Haugen SJ, Garcia JA, Baltz JH, Cleveland JC Jr, Novitzky D, Grover FL. *Circulation.* 2012;125:2827- 353
70. Hausenloy DJ. Cardioprotection during cardiac surgery. *Cardiovasc Res.* 2012; 94: 253-265
71. Hausenloy D.J., Yellon D.M. New directions for protecting the heart against ischaemia–reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15;61(3):448-60.
72. He B, Xiao J, Ren AJ, Zhang YF, Zhang H, Chen M, Xie B, Gao XG, Wang YW (2011) Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning. *J Biomed Sci* 18:22. doi:10.1186/1423-0127-18-22
73. Heid J, Cencioni C, Ripa R, Baumgart M, Atlante S, Milano G, Scopece A, Kuenne C, Guenther S, Azzimato V, Farsetti A, Rossi G, Braun T, Pompilio G, Martelli F, Zeiher AM, Cellerino A, Gaetano C, Spallotta F. Age-dependent increase of oxidative stress regulates microRNA-29 family preserving cardiac health. *Sci Rep.* 2017 ;7(1):16839
74. Hellström J, Öwall A , Öwall A, Bergström J, Sackey PV. Cardiac outcome after sevoflurane versus propofol sedation following coronary bypass surgery: a pilot study. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2011 Apr;55(4):460-7.

75. Hemmerling TM, Romano G, Terrasini N, Noiseux N. Anesthesia for off-pump coronary artery bypass surgery. *Ann Card Anaesth.* 2013;16:28-39.
76. Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, Ferrell JE, Brown PO. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol.*2009;7: e1000238
77. Heymans S, Corsten MF, Verhesen W, Carai P, van Leeuwen RE, Custers K, Peters T, Hazebroek M, Stöger L, Wijnands E, et al. Macrophage microRNA-155 promotes cardiac hypertrophy and failure. *Circulation.* 2013;128:1420–1432.
78. Hu Q, Luo W, Huang L, et al. Apoptosis-related microRNA changes in the right atrium induced by remote ischemic preconditioning during valve replacement surgery. *Sci Rep.* 2016; 6: 18959.
79. Hu ZY, Liu J. Mechanism of cardiac preconditioning with volatile anaesthetics. *Anaesth Intensive Care* 2009; 37: 532-538
80. Huan T, Rong J, Tanriverdi K, Meng Q, Bhattacharya A, McManus DD, Joehanes R, Assimes TL, McPherson R, Samani NJ, Erdmann J, Schunkert H, Courchesne P, Munson PJ, Johnson AD, O'Donnell CJ, Zhang B, Larson MG, Freedman JE, Levy D, Yang X. Dissecting the roles of microRNAs in coronary heart disease via integrative genomic analyses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 ;35(4):1011-21.
81. Hullinger TG, Montgomery RL, Seto AG, Dickinson BA, Semus HM, Lynch JM, et al. Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circ Res.* 2012;110:71-81
82. Humphreys DT, Hynes CJ, Patel HR, Wei GH, Cannon L, Fatkin D et al. Complexity of murine cardiomyocyte miRNA biogenesis, sequence variant expression and function. *PLoS ONE* 20127, e30933
83. Inserte J, García-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabés JA, Pina P, et al. Effect of inhibition of Na(+)/ Ca(2+) exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res.* 2002;55:739-48
84. Inserte J, Ruiz-Meana M, Rodríguez-Sinovas A, Barba I, Garcia-Dorado D. Contribution of delayed intracellular pH recovery to ischemic postconditioning protection. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 923-939
85. Inserte J, García-Dorado D, Hernando V, Soler-Soler J. Calpain-mediated impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia. *Circ Res.* 2005;97:465-73
86. Ishikawa M, Tanaka S, Arai M, Genda Y, Sakamoto A. Differences in microRNA changes of healthy rat liver between sevoflurane and propofol anesthesia. *Anesthesiology.* 2012 Dec;117(6):1245-52.
87. Izurieta R, Rabatin JT. Sedation during mechanical ventilation: a systematic review. *Crit Care Med.* 2002; 30:2644-2648

88. Jacobi J, Fraser GL, Coursin DB, Riker RR, Fontaine D, Wittbrodt ET, Chalfin DB, Masica MF, Bjerke HS, Coplin WM, Crippen DW, Fuchs BD, Kelleher RM, Marik PE, Nasraway SA Jr, Murray MJ, Peruzzi WT, Lumb PD; Task Force of the American College of Critical Care Medicine (ACCM) of the Society of Critical Care Medicine (SCCM), American Society of Health System Pharmacists (ASHP), American College of Chest Physicians. Clinical practice guidelines for the sustained use of sedatives and analgesics in the critically ill adult. *Crit Care Med.* 2002;30(1):119-41.
89. Julier K, da Silva R, Garcia C, Bestmann L, Frascarolo P, Zollinger A, Chassot PG, Schmid ER, Turina MI, von Segesser LK, Pasch T, Spahn DR, Zaugg M. Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicentre study. *Anesthesiology.* 2003; 98(6):1315-27
90. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2004;62(1):74-85
91. Kinnally KW, Antonsson B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* 2007; 12: 857-868
92. Kissin I. General anesthetic action: an obsolete notion? *Anesth Analg.* 1993;76(2):215-8.
93. Kokita N, Hara A, Abiko Y, Arakawa J, Hashizume H, Namiki A. Propofol improves functional and metabolic recovery in ischemic reperfused isolated rat hearts. *Anesth Analg.* 1998;86(2):252-258.
94. Kong KL, Bion JF. Sedating patients undergoing mechanical ventilation in the intensive care unit--winds of change?. *Br J Anaesth.* 2003; 90:267-269.
95. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H649-657
96. Krzych LJ, Szurlej D, Bochenek A. Rationale for propofol use in cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2009;23(6):878-85.
97. Kubler W, Haass M. Cardioprotection: definition, classification and fundamental principles. *Heart.* 1996;75:330-3
98. Kunst G, Klein AA. Peri-operative anaesthetic myocardial preconditioning and protection – cellular mechanisms and clinical relevance in cardiac anaesthesia. *Anaesthesia* 2015; 70: 467–482
99. Kutala VK, Khan M, Angelos MG, Kuppusamy P. Role of oxygen in postischemic myocardial injury. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 1193-1206

100. Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res.* 2009 Nov 1;84(2):201-8.
101. Ladilov Y, Efe O, Schäfer C, Rother B, Kasseckert S, Abdallah Y, Meuter K, Dieter Schlüter K, Piper HM. Reoxygenation-induced rigor-type contracture. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 1481-1490
102. Lamy A, Devereaux PJ, Prabhakaran D, Taggart DP, Hu S, Paolasso E, Straka Z, Piegas LS, Akar AR, Jain AR, Noiseux N, Padmanabhan C, Bahamondes JC, Novick RJ, Vaijyanath P, Reddy SK, Tao L, Olavegogeoascoechea PA, Airan B, Sulling TA, Whitlock RP, Ou Y, Pogue J, Chrolavicius S, Yusuf S; CORONARY Investigators. Effects of off-pump and on-pump coronary artery bypass grafting at 1 year. *N Engl J Med.* 2013;368:1179-88
103. Landoni G, Bignami E, Oliviero F, Zangrillo A. Halogenated anaesthetics and cardiac protection in cardiac and non-cardiac anaesthesia. *Ann Card Anaesth.* 2009;12:4-9.
104. Landoni G, Biondi-Zoccai GG, Zangrillo A, Bignami E, D'Avolio S, Marchetti C, Calabrò MG, Fochi O, Guarracino F, Tritapepe L, De Hert S, Torri G. Desflurane and sevoflurane in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2007;21(4):502-11.
105. Landoni G, Fochi O, Torri G. Cardiac protection by volatile anaesthetics: a review. *Curr Vasc Pharmacol.* 2008;6(2):108-11.
106. Landoni G, Fochi O, Tritapepe L, Guarracino F. Cardiac protection by volatile anesthetics. A review. *Minerva Anesthesiol.* 2009; 75:269-73.
107. Landoni G, Greco T, Biondi-Zoccai G, Nigro Neto C, Febres D, Pintaudi M, Pasin L, Cabrini L, Finco G, Zangrillo A. Anaesthetic drugs and survival: a Bayesian network meta-analysis of randomized trials in cardiac surgery. *Br J Anaesth.* 2013; 111 (6):886-896.
108. Landoni G, Guarracino F, Cariello C, Franco A, Baldassarri R, Borghi G, Covello RD, Gerli C, Crivellari M, Zangrillo A. Volatile compared with total intravenous anaesthesia in patients undergoing high-risk cardiac surgery: a randomized multicentre study . *Br J Anaesth.* 2014;113(6):955-63.
109. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*;1993;75:843–854.
110. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, Trollinger DR, Herman B, Cascio WE. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS* 1996; 76: 99-114

111. Lemoine S, Tritapepe L, Hanouz JL, and Puddu PE. The mechanisms of cardioprotective effects of desflurane and sevoflurane at the time of reperfusion: anaesthetic postconditioning potentially translatable to humans?. *Br J Anaesth.* 2016 Apr;116 (4): 456–75.
112. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120:15–20
113. Li J, Yang X, Guan H, Mizokami A, Keller ET, Xu X, Liu X, Tan J, Hu L, Lu Y, Zhang J. Exosome-derived microRNAs contribute to prostate cancer chemoresistance. *Int J Oncol.* 2016 ;49(2):838-46
114. Li P. MicroRNAs in cardiac apoptosis. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010;3:219-24.
115. Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, Liu S, Bueno E, Hansen AJ, et al. Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci.* 1998;1:494-500.
116. Liu B, Liu R, Zhang J, Song X, LV C. MicroRNA-708-3p as a potential therapeutic target via the ADAM17-GATA/STAT3 axis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Exp Mol Med.* 2018 ;50(3):e465
117. Liu N, Shi YF, Diao HY, Li YX, Cui Y, Song XJ et al. MicroRNA-135a Regulates Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide in Rat Cardiomyoblast Cells. *Int J Biol Sci.* 2017;13(1):13–21.
118. Liu Q, Du GQ, Zhu ZT, et al. Identification of apoptosis-related microRNAs and their target genes in myocardial infarction post-transplantation with skeletal myoblasts. *J Transl Med.* 2015; 13: 270.
119. Liu X, Meng H, Jiang C, Yang S, Cui F, Yang P. Differential microRNA Expression and Regulation in the Rat Model of Post-Infarction Heart Failure *PLoS One.* 2016 9;11(8):e0160920.
120. Lundblad RL. Development and application of biomarkers. Ed. CRC press Taylor&Francis Group. United States of America. 2011.
121. Lotz C, Kehl F. Volatile Anesthetic-Induced Cardiac Protection: Molecular Mechanisms, Clinical Aspects, and Interactions With Nonvolatile Agents *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 2015;6: 749 -760.
122. Lundblad RL. Development and application of biomarkers. Ed. CRC press Taylor&Francis Group. United States of America. 2011
123. McManus DD, Rong J, Huan T, Lacey S Tanriverdi K Munson PJ, Larson MG, Joehanes R, Murthy V, Shah R, Freedman J, Levy D. Messenger RNA and MicroRNA

- transcriptomic signatures of cardiometabolic risk factors. *BMC Genomics*. 2017;18(1):139
124. Meiser A, Laubenthal H. Inhalational anaesthetics in the ICU: theory and practice of inhalational sedation in the ICU, economics, risk-benefit. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2005;19:523-538
 125. Melero JM. ¿Cirugía coronaria sin bomba para todos? *Cir. Cardiovasc*. 2006;13(4):263-71
 126. Mendel PR, White PF. Sedation of the critically ill patient. *Int Anesthesiol Clin*. 1993; 31:185-200.
 127. Miller RD. Anestesia para los procedimientos de cirugía cardíaca. En: Miller RD; Eriksson LI, Fleisher LA et al. *Miller Anestesia 7ªed*. Ed. Elsevier; Barcelona; 2010: 1655-1742
 128. Mirabet M, García-Dorado D, Ruiz-Meana M, Barrabés JA, Soler-Soler J. Thrombin increases cardiomyocyte acute cell death after ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 39: 277-83.
 129. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.
 130. Na HS, Kim YI, Yoon YW, Han HC, Nahm SH, Hong SK. Ventricular premature beat-driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia. *Am Heart J*. 1996;132:78-83.
 131. Nickel EA, Benken I, Bartels U, Voelckel WG, Quintel M. AnaConDa as last resort treatment. Case report of a chronic obstructive pulmonary disease. *Anaesthesist*. 2007; 56:587-91.
 132. Novalija E, Varadarajan SG, Camara AK, An J, Chen Q, Riess ML, et al. Anesthetic preconditioning: triggering role of reactive oxygen and nitrogen species in isolated hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Jul;283(1):H44-52
 133. Obal D, Weber NC, Zacharowski K, Toma O, Dettwiller S, Wolter JI, Kratz M, Mullenheim J, Preckel B, Schlack W. Role of protein kinase C- ϵ (PKC- ϵ) in isoflurane induced cardioprotection. Low, but not high concentrations of isoflurane activate PKC. *Br J Anaesth*. 2005; 94(2): 166-73
 134. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*; 2007; 130:89–100
 135. Olson JM, Yan Y, Bai X, Ge ZD, Liang M, Kriegel AJ, et al. Upregulation of MicroRNA-21 Mediates Isoflurane-Induced Protection of Cardiomyocytes. *Anesthesiology*. 2015 Apr; 122(4): 795–805.

136. Otsuki T, Shikawa M, Hori Y, Goto G, Sakamoto A. Volatile anesthetic sevoflurane ameliorates endotoxin-induced acute lung injury via microRNA modulation in rats. *Biomed Rep.* 2015 May; 3(3): 408–412.
137. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R; Working Group of Cellular Biology of Heart of European Society of Cardiology. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res.* 2010;87(3):406-23.
138. Pan W, Pang LJ, Cai HL, Wu Y, Zhang W, Fang JC. MiR-1294 acts as a tumor suppressor in clear cell renal cell carcinoma through targeting HOXA6. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019 ;23(9):3719-3725.
139. Pagel PS, Hundetz JA. Delayed cardioprotection by inhaled anesthetics. *C Cardiothorac Vasc Anesth.* 2011; 25: 1125-1140
140. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000; 408:86–89
141. Penzo D, Petronilli V, Angelin A, Cusan C, Colonna R, Scorrano L, Pagano F, Prato M, Di Lisa F, Bernardi P. Arachidonic acid released by phospholipase A(2) activation triggers Ca(2+)-dependent apoptosis through the mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 25219-25225
142. Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J Cardiol.* 2011;3(6):186–200. doi: 10.4330/wjc.v3.i6.186.
143. Persson H1, Kvist A, Rego N, Staaf J, Vallon-Christersson J, Luts L, Loman N, Jonsson G, Naya H, Hoglund M, Borg A, Rovira C. Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene. *Cancer Res.* 2011 Jan 1;71(1):78-86
144. Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem* 2001; 276: 12030-12034
145. Peyró R, Soro M, Aldecoa C, Valía JC, Ramos F, Acosta F, Álvarez F, Navarro J, Soria C, Belda J. Protocolo terapéutico asistencial para la sedación inhalatoria con Sevoflurano a través del dispositivo AnaConDa® en pacientes ingresados en la unidad de cuidados críticos. Sección de Cuidados Críticos de la SEDAR. Madrid; 2010.
146. Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 365-371

147. Piper HM, Kasseckert S, Abdallah Y. The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 170-173
148. Piriou V, Mantz J, Goldfarb G, et al. Sevoflurane preconditioning at 1 MAC only provides limited protection in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a randomized bi-centre trial. *British Journal of Anaesthesia*. 2007; 99:624–3.
149. Poldermans D, Bax JJ, Boersma E, De Hert S, Eeckhout E, Fowkes G. Guía de práctica clínica para la valoración del riesgo cardiaco preoperatorio y el manejo cardiaco perioperatorio en la cirugía no cardiaca. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62:1467.e1-e56.
150. Porrello ER. microRNAs in cardiac development and regeneration. *Clin Sci*. 2013; 125: 151-166
151. Pravdic D, Hirata N, Barber L, Sedlic F, Bosnjak Z, Bienengraeber M. Complex I and ATP synthase mediate membrane depolarization and matrix acidification by isoflurano in mitochondria. *Eur J Pharmacol*. 2012; 690, 149-157
152. Qiao S, Olson JM, Paterson M, Yan Y, Zaja I, Liu Y, et al. MicroRNA-21 Mediates Isoflurane-induced Cardioprotection against Ischemia-Reperfusion Injury via Akt/Nitric Oxide Synthase/Mitochondrial Permeability Transition Pore Pathway. *Anesthesiology*. 2015 Oct;123(4):786-98
153. Quiao S, Xie H, Wang C, Wu X, Liu H, Liu C. Delayed anesthetic preconditioning protects against myocardial infarction via activation of nuclear factor- κ B and upregulation of autophagy. *J Anesth*. 2013 Apr; 27(2): 251-60
154. Ramírez M, Escalona JJ, Ramírez A, Rubio M, Cruz J. Mechanisms of cardioprotection of halogenated agents during extracorporeal circulation in cardiac surgery. *Curr vasc pharmacol* 2018;16(4):319-328 doi: 10.2174/1570161115666171116170806
155. Rawanduzy A, Hansen A, Hansen TW, Nedergaard M. Effective reduction of infarct volume by gap junction blockade in a rodent model of stroke. *J Neurosurg*. 1997;87:916-20.
156. Reimer KA, Jennings RB. Total ischemia in dog hearts, in vitro. II. High energy phosphate depletion and associated defects in energy metabolism, cell volume regulation and sarcolemmal integrity. *Circ Res*. 1981;49:901-11
157. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000;403:901–906
158. Riess ML, Stowe DF, Waltier C. Cardiac pharmacological preconditioning with volatile anesthetics: from bench to bedside. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286: H1603-1607.

159. Rodríguez-Sinovas A, García-Dorado D, Ruiz-Meana M, Soler-Soler J. Enhanced effect of gap junction uncouplers on macroscopic electrical properties of reperfused myocardium. *J Physiol.* 2004;559:245-57.
160. Ruggeri L, Landoni G, Guarracino F, Scolletta S, Bignami E, Zangrillo A. Remifentanyl in critically ill cardiac patients. *Ann Card Anaesth.* 2011;14:6-12
161. Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E, Garcia-Dorado D. Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca²⁺-overloaded cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* 2007; 102: 542-552
162. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM, Soler-Soler J. Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na⁽⁺⁾ through gap junctions. *Circ Res.* 1999;85:280-7
163. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, González MA, Barrabés JA, Oliveras J, Soler-Soler J. Efecto del edema osmótico durante la reoxigenación sobre la viabilidad celular: Estudio en el miocito aislado. *Rev Esp Cardiol.* 1995;48:266-71
164. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, González MA, Barrabés JA, Soler-Soler J. Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated cardiomyocytes following transient metabolic inhibition. *Cardiovasc Res.* 1995;30:64-9
165. Ryding AD, Kumar S, Worthington AM, Burgess D. Prognostic value of brain natriuretic peptide in noncardiac surgery: a meta-analysis. *Anesthesiology.* 2009;111(2):311-9.
166. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Nov;301(5):H1723-41.
167. Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 2008;455:58–63
168. Schulte C, Zeller T. microRNA-based diagnostics and therapy in cardiovascular disease-Summing up the facts. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2015 Feb;5(1):17-36.
169. Schulte C, Molz S, Appelbaum S, Karakas M, Ojeda F, Lau DM, Hatmann T, Lackner KJ, Westermann D, Schnabel RB, Nlanckenberg S, Zelle T, miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. *PLoS ONE.*2015;e0145930. doi: 10.1371/journal.pone.0145930
170. Sellke FW, DiMaio JM, Caplan LR, Ferguson TB, Gardner TJ, Hiratzka LF, Isselbacher EM, Lytle BW, Mack MJ, Murkin JM, Robbins RC; American Heart Association. Comparing onpump and off-pump coronary artery bypass grafting: numerous studies but few conclusions: a scientific statement from the American Heart

Association Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia in collaboration with the Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research. *Circulation*. 2005;111:2858-64

171. Sergeev O, da Silva R, Lucchinetti E, Zaugg K, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M. Trigger-dependent gene expression profiles in cardiac preconditioning: evidence for distinct genetic programs in ischemic and Anesthetic preconditioning. *Anesthesiology*. 2004 Mar; 100 (3): 474-88
172. Schultz TE . Sevoflurane administration in status asthmaticus: a case report. *AANA J*. 2005;73:35-6.
173. Shin C, Nam JW, Farh KK, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol Cell*, 2010; 38:789–802
174. Shulga N, Pastorino JG. Acyl coenzyme A-binding protein augments bid-induced mitochondrial damage and cell death by activating mu-calpain. *J Biol Chem* 2006; 281: 30824-30833
175. Sondermeijer BM, Bakker A, Halliani A, de Ronde MW, Marquart AA, Tijssen AJ, Mulders TA, Kok MG, Battjes S, Maiwald S, Sivapalaratnam S, Trip MD, Moerland PD, Meijers JC, Creemers EE, Pinto-Sietsma SJ. Platelets in patients with premature coronary artery disease exhibit upregulation of miRNA340* and miRNA624*. *PLoS One*. 2011;6(10):e25946.
176. Soro M, Badenes R, Garcia-Perez ML, Gallego-Ligorit L, Martí FJ, Aguilar G, Belda FJ. The accuracy of the anesthetic conserving device (AnaConDa) as an alternative to the classical vaporizer in anesthesia. *Anesth Analg*. 2010;111:1176-1179.
177. Soro M, Gallego L, Silva V, Ballester MT, Llorens J, Alvariño A, García-Pérez ML, Pastor E, Aguilar G, Martín FJ, Carratala A, Belda FJ. Cardioprotective effect of sevoflurane and propofol during anaesthesia and thepostoperative period in coronary bypass graft surgery: a double-blind randomised study. *Eur J Anaesthesiol*. 2012 Dec;29(12):561-9.
178. Stammers AH. Historical aspects of cardiopulmonary bypass: from antiquity to acceptance. *J. Cardiothorac Vasc Anesth*. 1997; 11: 266-74.
179. Steurer MP, Steurer MA, Baulig W, Piegeler T, Schlapfër M, Spahn DR, Falk V, Dreesen P, Theusinger OM, Schmid ER, Schwartz D, Neff TA, Beck-Schimmer B. Late pharmacologic conditioning with volatile anesthetics after cardiac surgery. *Crit Care*. 2012 Oct 14;16(5):R191.
180. Swyers T, Redford D, Larson DF. Volatile anesthetic-induced preconditioning. *Perfusion*. 2014;29(1):10-15

181. Taniguchi T, Tanaka S, Ishii A, et al. A brain-specific Grb2-associated regulator of extracellular signal-regulated kinase (Erk)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) (GAREM) subtype, GAREM2, contributes to neurite outgrowth of neuroblastoma cells by regulating Erk signaling. *J Biol Chem*. 2013;288(41): 20034-29942.
182. Thome JG, Mendoza MR, Cheuiche AV, La Porta VL, Silvello D, Dos Santos KG, Andrades ME, Clausell N, Rohde LE, Biolo A. Circulating microRNAs in obese and lean heart failure patients: A case-control study with computational target prediction analysis. *Gene*. 2015;574:1–10.
183. Trapani G, Altomare C, Liso G, Sanna E, Biggio E. Propofol in anesthesia. Mechanism of action, structure-activity relationships, and drug delivery. *Curr Med Chem*. 2000;7(2):249-71.
184. Tritapepe L, Landoni G, Guarracino G. Cardiac protection by volatile anaesthetics. A multicentre randomized controlled study in patients undergoing randomized controlled study in 111 patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Eur J Anaesthesiol*. 2007;24:323-331.
185. Tonkovic-Capin M, Gross GJ, Bosnjak ZJ, Tweddel JS, Fitzpatrick CM, Baker JE. Delayed cardioprotection by isoflurane: role of K (ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283: H61-H68.
186. Uecker M, Da Silva R, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M. Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* 2003 Jul;99(1):138-47.
187. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007;318:1931–1934
188. Wagner R, Piler P, Gabbasov Z, Mayura J, Mayura K, Nicovsky J, Kruzliak P. Adjuvant cardioprotection in cardiac surgery: update. *Biomed Res Int*. 2014;2014:808096.
189. Wang K, Jiang Z, Webster KA, Chen J, Hu H, Zhou Y, et al. Enhanced Cardioprotection by Human Endometrium Mesenchymal Stem Cells Driven by Exosomal MicroRNA-21. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Jan;6(1):209-222.
190. Wartier DC, al-Wathiqui MH, Kampine JP, Schmeling WT. Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. *Anesthesiology*. 1988;69(4):552-65.
191. Weber NC, Stursberg J, Wirthle NM, Toma O, Schlack W, Preckel B. Xenon preconditioning differently regulates p44/42 MAPK (ERK 1/2) and p46/54 MAPK (JNK 1/2 and 3) in vivo. *Br J Anaesth* 2006 ;97(3):298-306.

192. Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sarvary L, Strasser RH. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non- neuronal but PKC-dependent pathway- *Cardiovasc Res* 2002; 55: 590-601
193. Xia Z, Huang Z, Ansley DM. Large-dose Propofol during cardiopulm bypass decreases biochemical markers of myocardial injury in coronary surgery patients: a comparison with isoflurane. *Anesth Analg*. 2006; 103:527-32.
194. Xia Z, Li H, Irwin M.G. Myocardial ischaemia reperfusion injury: the challenge of translating ischaemic and anaesthetic protection from animal models to humans. *Br. J. Anaesth*. 2016 117 Suppl 2: ii44-ii62.
195. Xu H, Li J, Zhao Y, Liu D. microRNA expression and its potential role in cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs. *Pflugers Arch*. 2014 Oct;466(10):1953-61. doi: 10.1007/s00424-013-1429-3.
196. Yang B, Lu Y, Wang Z. Control of cardiac excitability by microRNAs. *Cardiovasc Res*. 2008 Sep 1;79(4):571-80
197. Yang JA, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, et al. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA*. 2011; 17:312–326
198. Yang KC, Ku YC, Lovett M, Nerbonne JM. Combined deep microRNA and mRNA sequencing identifies protective transcriptomal signature of enhanced PI3Kalpha signalling in cardiac hypertrophy. *J Mol CellCardiol*. 2012;53:101-12
199. Yang Q, Yang K, Li A. microRNA- 21 protects against ischemia- reperfusion and hypoxia- reperfusion- induced cardiocyte apoptosis via the phosphatase and tensin homolog/Akt- dependent mechanism. *Mol Med Rep*. 2014; 9(6):2213-2220
200. Yang Y, Ding S, Xu G, Chen F, Ding F. MicroRNA-15a inhibition protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes by targeting mothers against decapentaplegic homolog 7. *Mol Med Rep*. 2017 Jun;15(6):3699-3705. doi: 10.3892/mmr.2017.6466.
201. Zaugg M, Lucchinetti E, Uecker M, Pasch T, Schaub MC. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br J Anaesth*. 2003 Oct;91(4):551-65.
202. Zaugg M, Lucchinetti E, Uecker M, Pasch T, Schaub MC. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part II. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br Journal of Anaesth* 2003; 91 (4): 566-76.
203. Zeng XC, Li L, Wen H, Bil Q. MicroRNA-128 inhibition attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury-induced cardiomyocyte apoptosis by the targeted activation

- of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Med Rep.* 2016 Jul; 14(1): 129–136.
204. Zhang ZW, Li H, Chen SS, Li Y, Cui ZY, Ma J. MicroRNA-122 regulates caspase-8 and promotes the apoptosis of mouse cardiomyocytes. *Braz J Med Biol Res.* 2017 Feb 6;50(2):e5760. doi: 10.1590/1414-431X20165760.
205. Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury. *Cardiovasc Res.* 2006; 70: 200-11.
206. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H579–H588.
207. Zhu H, Fan GC. Role of microRNAs in the reperfused myocardium towards post-infarct remodelling. *Cardiovasc Res.* 2012;94:284-92
208. Sedación prolongada en unidades de cuidados intensivos. *Med Intensiva* 2008. Supl 1: 19 – 30

RESEARCH ARTICLE

NGS of microRNAs Involved in Cardioprotection Induced by Sevoflurane Compared to Propofol in Myocardial Revascularization Surgery: The ACDHUVV-16 Clinical Trial

Jose Luis Guerrero Orriach^{1,2,*}, Juan Jose Escalona Belmonte^{1,2}, Marta Ramirez Aliaga^{1,2}, Alicia Ramirez Fernandez^{1,2}, Maria Jose Rodriguez Capitan^{1,2}, Guillermo Quesada Muñoz^{1,2}, Aida Raigón Ponferrada^{1,2}, Juan Alcaide Torres³, Concepcion Santiago-Fernandez^{2,3}, Emilio Matute Gonzalez⁴, Manuel Rubio Navarro^{1,2}, Rocio Bautista⁵, Josefa Gómez Maldonado⁵, Lourdes Garrido-Sanchez^{2,3,6,8} and Jose Cruz Mañas^{1,2,8}

¹Department of Cardio-Anesthesiology, University Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain; ²Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Málaga, Spain; ³Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain; ⁴Department of Anesthesia, Hospital Universitario, Sanitas La Moraleja, Spain; ⁵Genomic and Ultrasecuenciación, Supercomputación y Bioinnovación Center, Malaga University, Malaga, Spain; ⁶CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición-CIBEROBN, Instituto de Salud, Carlos III, Spain

Abstract Background: Numerous studies have demonstrated that halogenated agents elicit myocardial conditioning effects when administered perioperatively in cardiac surgery. Recent evidence has been published on the benefits of maintaining exposure to halogenated agents during the early postoperative period. The enzymatic mechanisms by which this beneficial effect is exerted were explained recently.

Objective: Our study was performed to investigate whether this phenomenon is mediated by either the activation or suppression of miRNAs targeted by halogenated anesthetics.

Methods: A double-blind, two-stage trial was conducted. The results of the first stage of the trial are presented in this paper. The sample was composed of patients undergoing off-pump myocardial revascularization surgery. Patients were randomized to receive either sevoflurane (S) or propofol (P) during the intraoperative and early postoperative period (during the first six hours after the intervention). Hemodynamics (heart rate, blood pressure, central venous pressure, cardiac index, systolic volume index, LVEF) and myocardial enzymes (troponin I) were monitored at six hour intervals during the first 48 hours. In the first stage of the trial, blood was drawn for gene sequencing from eight patients (four per group) at baseline and at 24 h. In the second stage of the study, a qPCR analysis was performed of the miRNAs identified as significant by gene sequencing. Levels of cardioprotective enzymes (serine/threonine protein kinase (Akt), tumor necrosis factor alpha (TNF α), extracellular regulated protein kinase (ERK 1/2), and caspase 3) were measured to assess their role in myocardial conditioning pathways. The purpose was to identify the miRNAs that play a major role in myocardial conditioning induced by halogenated agents. Concentrations of cardioprotective enzymes were higher in patients who received sevoflurane than the patients who were administered propofol.

Results: NGS differences were observed between baseline and 24-h values in the two study groups. In group P, miRNA 197-3p was overexpressed, whereas miRNAs 4443 and 1294, 708-3p were underexpressed. In group S, miRNAs 615-3p, 4466, 29, 937-3p, 636, 197-3p, 184, 4685, 296-3p, 147h, 3199, 6815, 1294 and 3176 were underexpressed; whereas 708-3p was overexpressed. qPCR showed significant variations in miRNAs 197-3p, 4443, 708-3p and 1294 in the P group, and in miRNAs 937-3p, 636, 197-3p, 296-3p and 708-3p in the S group.

Conclusions: In the P Group, changes in the expression of some miRNAs were associated with lower concentrations of the enzymes involved in myocardial pre- and postconditioning. In contrast, in Group S, variations in miRNAs were associated with the activation of mediators of anesthetic-induced pre- and post-conditioning, a reduction in cell apoptosis, and a decrease in caspase and TNF α concentrations. Changes in these miRNAs were associated with better prognosis in patients with ischemic heart disease. The main limitation of this study will be overcome in the second stage of the trial, where the specific role of each miRNA will be determined.

ARTICLE HISTORY

Received June 29, 2020
Revised August 12, 2020
Accepted August 12, 2020

DOI:
10.2174/09397001210190210001200007

Keywords: miRNAs, cardiac anesthesia, preconditioning, postconditioning, acondicioning, halogenated.

*Address correspondence to this author at the Department of Cardio-Anesthesiology, University Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain; Tel: +34951032648; Fax: +34 951924651; E-mail: guerreroorriach@gmail.com

[†]These authors contribute equally to the manuscript.

REVIEW ARTICLE

Anesthetic-induced Myocardial Conditioning: Molecular Fundamentals and Scope

J.L. Guerrero Orriach^{1,2,3*}, J.J. Escalona Belmonte², M. Ramirez Aliaga^{2,*},
A. Ramirez Fernandez², A. Raigón Ponferrada², M. Rubio Navarro² and J. Cruz Mañas²

¹Institute of Biomedical Research in Malaga [IBIMA], Malaga, Spain; ²Department of Cardio-Anaesthesiology, Virgen de la Victoria University Hospital, Malaga, Spain; ³Department of Pharmacology and Pediatrics, School of Medicine, University of Malaga, Malaga, Spain

Abstract: Background: The pre- and post-conditioning effects of halogenated anesthetics make them most suitable for cardiac surgery. Several studies have demonstrated that the mechanism of drug-induced myocardial conditioning is enzyme-mediated via messenger RNA and miRNA regulation. The objective of this study was to investigate the role that miRNAs play in the cardioprotective effect of halogenated anesthetics. For such purpose, we reviewed the literature to determine the expression profile of miRNAs in ischemic conditioning and in the complications prevented by these phenomena.

Methods: A review was conducted of more than 100 studies to identify miRNAs involved in anesthetic-induced myocardial conditioning. Our objective was to determine the miRNAs that play a relevant role in ischemic disease, heart failure and arrhythmogenesis, which expression is modulated by the perioperative administration of halogenated anesthetics. So far, no studies have been performed to assess the role of miRNAs in anesthetic-induced myocardial conditioning. The potential of miRNAs as biomarkers and miRNAs-based therapies involving the synthesis, inhibition or stimulation of miRNAs are a promising avenue for future research in the field of cardiology.

Results: Each of the cardioprotective effects of myocardial conditioning is related to the expression of several (not a single) miRNAs. The cumulative evidence on the role of miRNAs in heart disease and myocardial conditioning opens new therapeutic and diagnostic opportunities.

Conclusion: Halogenated anesthetics regulate the expression of miRNAs involved in heart conditions. Further research is needed to determine the expression profile of miRNAs after the administration of halogenated drugs. The results of these studies would contribute to the development of new hypnotics for cardiac surgery patients.

ARTICLE HISTORY

Received: February 15, 2019
Revised: August 23, 2019
Accepted: September 20, 2019

DOI:
10.2174/0929667320190200011427

Keywords: miRNAs, cardiac anesthesia, preconditioning, postconditioning, aconditioning, halogenated.

1. INTRODUCTION

miRNAs are non-encoding RNA molecules 19 to 25 nt in length (bases) related to posttranscriptional gene silencing [1]. Mature miRNA cleaved by the enzymes Drosha and Dicer has an average of 22 nucleotides. miRNA binds RNAm in a single way via Watson-Crick

base-pairing. The seed sequence is a conserved heptamer sequence which is mainly located at positions 2-7 of the 5' end of a mature miRNA. Although base pairing of miRNA and its target mRNA does not match perfect, the seed sequence has to be perfectly complementary. miRNA inhibits mRNA translation (protein synthesis) or induces its degradation. Thus, accessibility for base pairing and complementarity of miRNA and mRNA highly depend on the modulation of mRNA by miRNA [5].

*Address correspondence to these authors at the Hospital Virgen de la Victoria, University Campus Teatinos C.P. 29010, Malaga, Spain, E-mails: guerreroorriach@terra.com, marraam85@hotmail.com