

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Facultad de Biología

Departamento de Fisiología



**EFFECTOS DE LA HIPEROXIA SOBRE EL PULMÓN:
ESTUDIO IN VIVO E IN VITRO.**

**Memoria de la Tesis Doctoral presentada por María José Alcaraz García para
optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Murcia.**

Dirigida y supervisada por:

**Dr. Fernando Sánchez Gascón, Dr. Salvador Zamora y Dr. Agustín Olea
González**

Murcia, 2008

D. FRANCISCO JAVIER SALAZAR APARICIO, Director del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia.

CERTIFICA:

Que el trabajo: **“Efectos de la hiperoxia sobre el pulmón: Estudio in Vivo e in Vitro”**, realizada por la licenciada D^a María José Alcaraz García y dirigida por los Profesores Zamora Navarro S. y Sánchez Gascón F. ha sido aprobado en Junta de Departamento y reúne todas las condiciones para poder optar su autora al grado de Doctora en Biología mediante la correspondiente defensa pública.

Y para que conste donde convenga firmo el presente en Murcia a 8 de Febrero del dos mil ocho.

D. FERNANDO SÁNCHEZ GASCÓN, Profesor titular del departamento de Medicina Interna de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia.

CERTIFICA

que el Trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis **“Efectos de la hiperoxia sobre el pulmón: Estudio in Vivo e in Vitro”** ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada D^a **MARÍA JOSÉ ALCARAZ GARCÍA** entre los años 2003 y 2008, correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada, la presente memoria ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor ante el Tribunal que en su momento se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en Murcia, a 14 de Febrero del 2008.

SALVADOR ZAMORA NAVARRO, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia.

CERTIFICA

que el Trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis **“Efectos de la hiperoxia sobre el pulmón: Estudio in Vivo e in Vitro”** ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada D^a **MARÍA JOSÉ ALCARAZ GARCÍA** entre los años 2003 y 2008, correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada, la presente memoria ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor ante el Tribunal que en su momento se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en Murcia, a 14 de Febrero del 2008.

D. AGUSTÍN OLEA GONZÁLEZ, Comandante Médico de la Unidad de Investigación Subacuática del Centro de Buceo de la Armada.

CERTIFICA

que el Trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis **“Efectos de la hiperoxia sobre el pulmón: Estudio in Vivo e in Vitro”** ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada D^a **MARÍA JOSÉ ALCARAZ GARCÍA** entre los años 2003 y 2008, correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada, la presente memoria ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor ante el Tribunal que en su momento se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en Murcia, a 8 de Febrero del 2008.

La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es “¡Eureka!”, sino “Es extraño...”.

Isaac Asimov (1920-1992).

IN MEMORIAM

A Fernando Sánchez Gascón, por ser mi mentor y amigo, por ese corazón tan grande que poseía, por darme la oportunidad de conocerlo, porque no pasa un solo día en que no lo recuerde y porque todo lo que soy profesionalmente se lo debo a él. Se que donde estás te llegará mi más sincero agradecimiento. Gracias por todo, querido Fernando.



A **Antonio**, mi compañero, amigo y cómplice durante los últimos nueve años de mi vida. Por estar siempre a mi lado, por todo lo que ya hemos vivido juntos y porque sin ti, cariño, la vida no tendría ningún sentido.

A MI FAMILIA

A mis padres Salvador y Antonia, por aceptarme siempre como soy.

A mis hermanos Salvador y Ramón, por poder contar con ellos cada vez que los necesito.

A mi hermana Toñi, por ser la persona que mejor me conoce en este mundo.

A mi suegra Emilia, por tratarme como a una hija.

A mi suegro Ginés, porque lo siento conmigo cada día.

A mis cuñados Isa y Nacho, por acogerme en sus vidas sin reparos desde el primer día.

A MIS AMIGOS

A Loles, Sonia, Jose, Encarni, Mar, Maria De, Mari Cruz, Laura y Sonia, por conocer el verdadero sentido de la amistad y por darme esos buenos momentos que uno tanto necesita durante la tesis.

“La amistad es un alma que habita en dos cuerpos; un corazón que habita en dos almas”.

AGRADECIMIENTOS.-

Al Profesor Salvador Zamora, mi tutor, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo y por no dejarme a la deriva cuando Fernando ya no estaba.

A Agustín, por la paciencia que siempre me ha demostrado y porque sin él no lo hubiese conseguido.

Al CN. D. Amador Sánchez Silvente, por el espíritu investigador que siempre ha albergado pero sobre todo por ser un amigo.

Al CN. D. Enrique Guitart, por hacer posible que este trabajo pasara de ser una mera idea a una realidad y por su apoyo en todo momento. Gracias, en ti he descubierto un verdadero amigo.

Al Jefe del Centro de Buceo de la Armada CN. D. Antón Contreras, por la colaboración que siempre me ha prestado.

Al Dr. Sznajder, por la gran oportunidad que me brindó muy lejos de España.

A la familia Peña, por acogerme como a una hija cuando más lo necesitaba.

A todo el personal de la Unidad de Investigación Subacuática tanto militar como civil, por hacerme ver la vida desde otra perspectiva.

A Soledad Parra y a M^a Dolores Albaladejo del Departamento de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, por sus sabios consejos tanto en el ámbito profesional como en el personal.

A Paco Pepe y a Bea, por su paciencia con los buzos y conmigo.

Al Hospital Naval de Cartagena, por la ayuda prestada en este trabajo.

Al personal del SACE, en especial a Pepe, por estar siempre a mi lado incluso cuando más pérdida estaba.

A Pedro Castell, por el ánimo que sus palabras me transmitieron en un momento delicado para todos.

A todos los compañeros del departamento de fisiología por hacerme más llevadero el trabajo.

A todos los que me han demostrado ser mis compañeros y amigos a lo largo de estos cuatro años, en especial a Pedro, Antonio, Rocío, Tomás, Albino, Juanito, Víctor... . Gracias a todos ellos.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ATA = Atmósfera absoluta

SNC = Sistema Nervioso Central

mmHg = Milímetros de Mercurio (760 mmHg = 1 ATA)

C.R.I.S = Centro de Recuperaciones e Investigaciones Subacuáticas

F.E.D.A.S = Federación Española de Actividades Subacuáticas

C.I.B = Centro de Instrucción de Buceo

U.E.B.C = Unidad Especial de Buceadores de Combate

C.B.A = Centro de Buceo de la Armada

CV = Capacidad Vital

PIO₂ = Presión inspirada de oxígeno

FVC = Capacidad vital forzada

FEV1 = Volumen espiratorio forzado en el primer segundo

FEF_{25/75} = Flujo espiratorio forzado entre el 25% y el 75% de la capacidad vital forzada

DLCo = Factor de transferencia del monóxido de carbono

kPa = Kilopascales (1 ATA = 101.3250 kPa)

SOD = Superóxido Dismutasa

ROS = Especies Reactivas de Oxígeno

BAC = Barrera alveolocapilar

TdT = Deoxinucleotidil Transferasa

dUTP = Nucleótido marcado con fluoresceína

TAS = Estado Antioxidante Total

LDH = Lactato Deshidrogenasa

VCM = Volumen Corpuscular Medio

HCM = Hemoglobina Corpuscular Media

CHCM = Concentración Hemoglobina Corpuscular Media

RDW = Índice Dispersión Eritrocitaria

VPM = Volumen Plaquetario Medio

LVA = Linfocitos Valor Absoluto

NVA = Neutrófilos Valor Absoluto

MVA = Monocitos Valor Absoluto

EVA = Eosinófilos Valor Absoluto

BVA = Basófilos Valor Absoluto

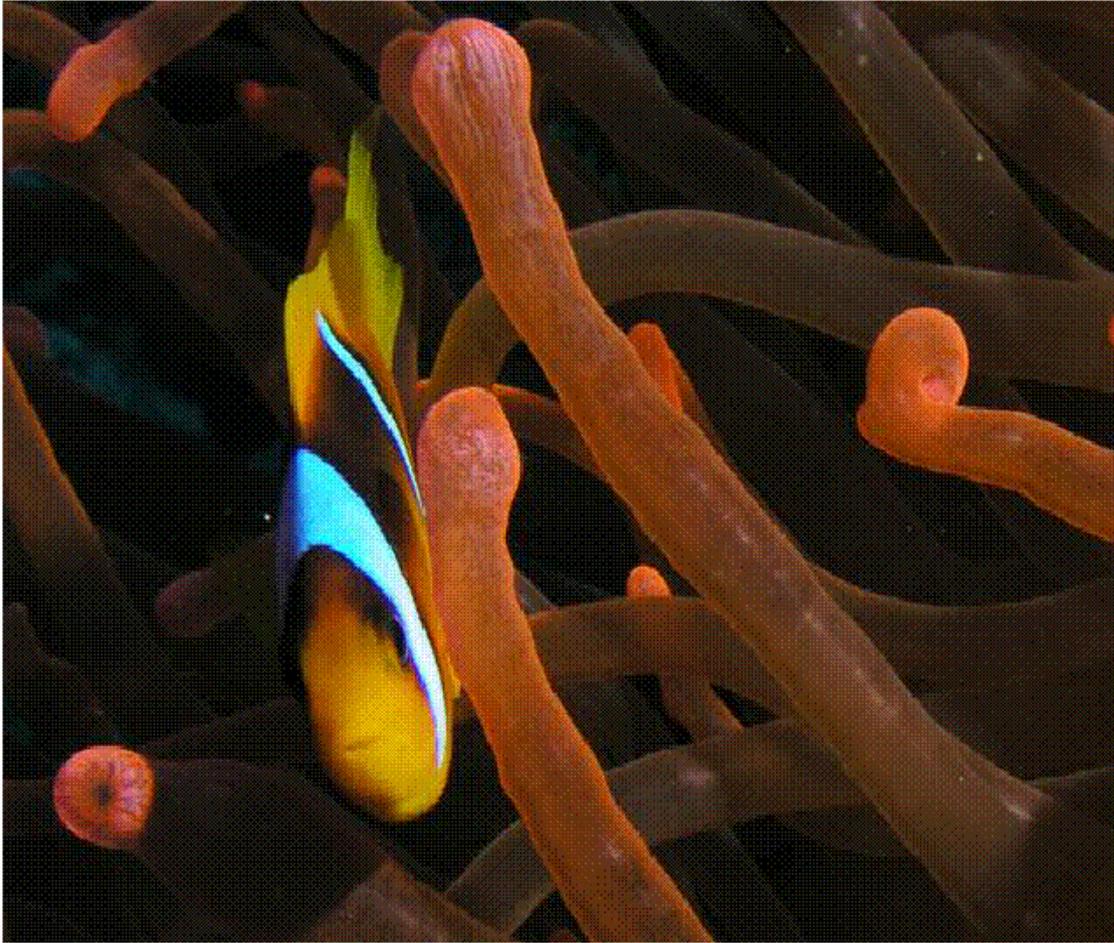
TOR = diana para la rapamicina

P₂ = receptor de membrana purinérgico

eNOS = óxido nítrico endotelial

UIS = Unidad de Investigación Subacuática

UEBC = Unidad Especial de Buceo de Combate



ÍNDICE

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	17
1. Perspectiva Histórica	17
1. 1. Evolución del Oxígeno atmosférico	17
1. 2. Historia del Oxígeno	19
1. 3. Historia del Buceo Militar en España	22
2. Biofísica del Oxígeno	26
3. Manifestaciones de la Intoxicación por Oxígeno	28
I. 3.1. Signos y síntomas de toxicidad pulmonar por oxígeno	28
<u>3.1.1. Efectos de la Intoxicación por Oxígeno In Vitro</u>	28
<u>3.1.2. Efectos de la Intoxicación por Oxígeno In Vivo</u>	29
3.1.2.1. Influencia de la humedad en la intoxicación pulmonar por oxígeno In Vivo.	30
<u>3.1.3. Efectos de la Intoxicación por Oxígeno en Humanos</u>	30
3.1.3.1. Efectos de la Intoxicación por Oxígeno en los parámetros pulmonares	31
A) Afectación de la función pulmonar	31
B) Tolerancia al Oxígeno	35
3.2. Síntomas y signos de la intoxicación por oxígeno en el SNC	
<u>3.2.1. Ataques Hiperóxicos</u>	38
<u>3.2.2. Cambios en la Actividad Eléctrica Cerebral</u>	39
3.3. Efectos Tóxicos del Oxígeno en el Ojo	40
3.4. Otras Manifestaciones de la Toxicidad por Oxígeno	42
<u>3.4.1. Sistema Hematopoyético</u>	42
<u>3.4.2. Vasoconstricción</u>	42
<u>3.4.3. Oído</u>	43
4. Mecanismos de Daño Oxidativo y Defensas Antioxidantes	
4.1. Especies Reactivas de Oxígeno	43
4.2. Fuentes de Especies Reactivas de Oxígeno en el Pulmón	44
4.3. Comparación de Producción de ROS entre varios Tipos de Células en el Pulmón	46
4.4. Efectos de las Especies Reactivas de Oxígeno	47
4.5. Regulación de la Actividad Sintasa de Óxido Nítrico en Respuesta a la Hiperoxia	48
4.6. Interacciones con Membranas Plasmáticas	51
<u>4.6.1. Peroxidación Lipídica</u>	51
4.7. Defensas Antioxidantes	53
<u>4.7.1. Superóxido Dismutasa</u>	53
<u>4.7.2. Glutathion Peroxidasa</u>	54

4.7.3. Óxido Nítrico y Peroxinitritos	54
4.7.4. <u>Inversión del Daño Oxidativo</u>	55
II. OBJETIVO	57
III. MATERIAL Y METODOS	59
1. In Vitro (Neumocitos)	59
1.1. Células y Cultivo	59
1.2. Curva de Crecimiento	59
1.3. Detección de micoplasmas	61
1.4. Tratamiento con Oxígeno	61
1.5. Estudio Viabilidad Celular	62
1.5.1. <u>Método del Azul de Tripán</u>	62
1.5.2. <u>Test de Viabilidad (ensayo del MTT)</u>	63
1.5.3. <u>Ensayo de la Lactato Deshidrogenasa (LDH)</u>	65
1.6. Detección de Especies Reactivas de Oxígeno	65
1.7. Detección de Muerte Celular In Situ (POD)	66
2. In Vivo	66
2.1. En animales de experimentación (Ratas)	66
2.1.1. <u>Equipos Analíticos Necesarios</u>	66
2.1.2. <u>Diseño del Experimento</u>	67
2.1.3. <u>Estudio Morfológico</u>	70
2.2. En Humanos (Buceadores)	71
2.2.1. <u>Sujetos</u>	71
2.2.2. <u>Parámetros del Hemograma</u>	71
2.2.2.1. Leucocitos	71
2.2.2.2. Hematíes	72
2.2.2.3. Hemoglobina	72
2.2.2.4. Hematocrito	72
2.2.2.5. Volumen Corpuscular Medio (VCM)	73
2.2.2.6. Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)	73
2.2.2.7. Concentración Hemoglobina Corpuscular Media	73
2.2.2.8. Índice Dispersión Eritrocitaria (RDW)	73
2.2.2.9. Plaquetas	74
2.2.2.10. Volumen Plaquetario Medio (VPM)	74
2.2.2.11. Plaquetocrito	74
2.2.2.12. Linfocitos %	74
2.2.2.13. Neutrófilos %	75
2.2.2.14. Monocitos %	75
2.2.2.15. Eosinófilos %	75
2.2.2.16. Basófilos %	76
2.2.2.17. Linfocitos Valor Absoluto (LVA)	76
2.2.2.18. Neutrófilos Valor Absoluto (NVA)	76
2.2.2.19. Monocitos Valor Absoluto (MVA)	76
2.2.2.20. Eosinófilos Valor Absoluto (EVA)	76
2.2.2.21. Basófilos Valor Absoluto (BVA)	76

<u>2.2.3. Cuantificación Óxido Nítrico</u>	77
<u>2.2.4. Estado Antioxidante Total</u>	77
<u>2.2.5. Glutation Peroxidasa</u>	77
<u>2.2.6. Isoprostanos Urinarios</u>	78
<u>2.2.7. Método Estadístico</u>	78
IV. RESULTADOS	81
1 In Vitro	81
1.1. Parte Descriptiva De Los Resultados	81
<u>1.1.1. Curva de Crecimiento en condiciones normales</u>	81
<u>1.1.2. Detección de Micoplasmas</u>	83
<u>1.1.3. Ensayo del MTT en condiciones hiperóxicas</u>	83
<u>1.1.4. Ensayo de la Lactato Deshidrogenasa (LDH)</u>	86
<u>1.1.5. Detección de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)</u>	87
<u>1.1.6. Detección de Muerte Celular In Situ (POD)</u>	89
1.2. Análisis Estadístico De Los Resultados	92
<u>1.2.1. Ensayo del MTT en condiciones hiperóxicas</u>	92
<u>1.2.2. Ensayo de la Lactato Deshidrogenasa (LDH)</u>	94
<u>1.2.3. Detección de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)</u>	95
<u>1.2.4. Detección de Muerte Celular In Situ (POD)</u>	96
2. In Vivo	98
2.1. En animales de experimentación (Ratas)	98
<u>2.1.1. Parte Descriptiva De Los Resultados</u>	98
<u>2.1.2. Análisis Anatomopatológico</u>	99
<u>2.1.3. Análisis Estadístico De Los Resultados</u>	100
2.2. En Humanos (Buceadores)	103
<u>2.2.1. Parte Descriptiva De Los Resultados</u>	103
2.2.1.1. Edad	103
2.2.1.2. Talla	103
2.2.1.3. Peso	104
2.2.1.4. Índice de masa corporal (IMC)	104
2.2.1.5. Alergias	104
2.2.1.6. Actividad Física	104
2.2.1.7. Hábito Tabáquico	105
2.2.1.8. Categoría Militar	105
2.2.1.9. Dieta	105
2.2.1.10. Resultados de las analíticas	107
2.2.1.10.1. Leucocitos	107
2.2.1.10.2. Hematíes	107
2.2.1.10.3. Hemoglobina	108
2.2.1.10.4. Hematocrito	109
2.2.1.10.5. Volumen Corpuscular Medio (VCM)	109

2.2.1.10.6. Hemoglobina Corpuscular Media	110
2.2.1.10.7. Concentración Hemoglobina Corpuscular Media	111
2.2.1.10.8. Índice Dispersión Eritrocitaria (RDW)	111
2.2.1.10.9. Plaquetas	112
2.2.1.10.10. Volumen Plaquetario Medio (VPM)	113
2.2.1.10.11. Plaquetocrito	113
2.2.1.10.12. Linfocitos %	114
2.2.1.10.13. Neutrófilos %	115
2.2.1.10.14. Monocitos %	115
2.2.1.10.15. Eosinófilos %	116
2.2.1.10.16. Basófilos %	117
2.2.1.10.17. Linfocitos Valor Absoluto (LVA)	117
2.2.1.10.18. Neutrófilos Valor Absoluto (NVA)	118
2.2.1.10.19. Monocitos Valor Absoluto (MVA)	119
2.2.1.10.20. Eosinófilos Valor Absoluto (EVA)	119
2.2.1.10.21. Basófilos Valor Absoluto (BVA)	120
2.2.1.11. Resultados del Estado Antioxidante total	124
2.2.1.12. Resultados del NO	124
2.2.1.13. Resultados de GPx e Isoprostanos	124
<u>2.2.2. Análisis Estadístico De Los Resultados</u>	125
2.2.2.1. Volumen Corpuscular Medio (VCM)	125
2.2.2.2. Índice de Dispersión Eritrocitaria (RDW)	126
2.2.2.3. Plaquetas	126
2.2.2.4. Volumen Plaquetario Medio (VPM)	127
2.2.2.5. Plaquetocrito	127
2.2.2.6. Linfocitos %	128
2.2.2.7. Neutrófilos %	128
2.2.2.8. Linfocitos Valor Absoluto (LVA)	129
2.2.2.9. Neutrófilos Valor Absoluto (NVA)	129
2.2.2.10. Óxido Nítrico (NO)	130
2.2.2.11. Estado Antioxidante Total (TAS)	130
2.2.2.12. Glutation Peroxidasa (GPx)	131
2.2.2.13. Isoprostanos	131
V. DISCUSIÓN	133
1 Sobre el cultivo de neumocitos	133
2. Sobre la agresión del oxígeno “ <i>In Vivo</i> ”	142
2.1. Sobre la agresión del oxígeno en ratas	142
2.2. Sobre la agresión del oxígeno en buceadores	146
VI CONCLUSIONES	155
VII. BIBLIOGRAFÍA	159



INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Perspectiva Histórica

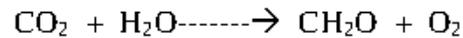
1. 1. Evolución del Oxígeno atmosférico

Desde que la Tierra se formó hace 5 billones de años¹, la atmósfera ha estado sometida a continuas variaciones en cuanto a su composición.

Gilbert², cita algunos autores que aseguran que la primitiva atmósfera estaba constituida por hidrógeno y compuestos hidrogenados de oxígeno, nitrógeno y carbono, como por ejemplo agua, amoníaco y metano. Otros, como Hart³ y Walker⁴ afirman que originariamente la atmósfera se formó por una lenta liberación de gases procedentes de la corteza y capas externas, siendo sus principales constituyentes el H₂O y el CO₂, con menor proporción de N₂; el H₂O se condensó rápidamente formando los océanos mientras que el CO₂ disminuyó poco a poco disolviéndose en ellos, reaccionando con los silicatos o depositándose en piedras calizas y otras rocas carbónicas sedimentarias. De este modo hace 2.5 billones de años, la atmósfera llegaría a ser rica en nitrógeno, aunque aún no había oxígeno libre en cantidades significativas⁵. En este momento, las únicas formas de vida eran las bacterias y algas cianofíceas (pardoazuladas) que debieron formarse espontáneamente en una atmósfera reductora compuesta por metano y CO₂.

A partir de la Era Precámbrica⁶, la atmósfera terrestre se enriqueció en oxígeno debido fundamentalmente a dos procesos: En primer lugar a la fotodisociación del H₂O por los rayos ultravioleta solares en la superficie de la atmósfera seguida por un escape de hidrógeno, siendo ésta la fuente abiótica más importante de oxígeno libre⁵. El segundo proceso, constituye la más importante

fuente de oxígeno y es conocido como fotosíntesis^{1,2}. Consiste, como sabemos, en la conversión de energía solar en energía química por oxidación del agua y reducción del oxígeno:



La fotosíntesis se realiza cuatro veces más en la tierra que en el agua, a pesar de que ésta ocupa las tres cuartas partes del globo. Hay que tener en cuenta que en el agua sólo ocurren procesos fotosintéticos por encima de los 200 metros y que el contenido de oxígeno es 30 veces superior en la atmósfera que en el mar, siendo además en este último mucho menos constante por lo que los animales acuáticos, en contraste con los terrestres, tendrían mayor peligro de extinción. De cualquier modo, la hidrosfera supone el segundo reservorio de oxígeno, con un 10% del total en forma de agua.

Una vez modificada la composición del aire atmosférico merced a la elevación de oxígeno ambiental, se originó un cambio en la biosfera que dio paso a formas de vida más evolucionadas. Así los primitivos organismos unicelulares y pequeños metazoos no precisaban ningún sistema de transporte de oxígeno, ya que éste era directamente asimilado por difusión desde el ambiente al interior de la célula. Pero este sistema se mostró totalmente insuficiente para suministrar el oxígeno necesario para satisfacer las demandas metabólicas de los organismos pluricelulares de mayor complejidad que aparecieron más tarde: De esta forma los vertebrados han hecho evolucionar dos mecanismos principales para proveer a sus células de un flujo adecuado de oxígeno: El primero de ellos, es un sistema circulatorio que aporta oxígeno activamente a las células; en ausencia de este sistema, el límite de tamaño de un organismo aeróbico sería de 1 mm, puesto que la difusión de oxígeno sobre dimensiones superiores es demasiado lenta para cubrir las

necesidades celulares. El segundo mecanismo está constituido por las moléculas transportadoras de oxígeno cuya existencia contrarresta la baja solubilidad de este gas en el agua⁷.

Así pues, la mayoría de animales y plantas se adaptaron a las nuevas condiciones atmosféricas al desarrollar durante su evolución mecanismos enzimáticos y no enzimáticos capaces de controlar los procesos oxidativos derivados de la acción del oxígeno. La imposibilidad de hacer frente a estos procesos ha hecho pensar a algunos autores como Schatz⁸ que la extinción de ciertas especies prehistóricas como los dinosaurios, pudo estar causada por un efecto tóxico del oxígeno al no ser capaces estos animales de desarrollar sistemas de protección frente al aumento de oxígeno ambiental.

1. 2. Historia del Oxígeno

El oxígeno fue descubierto en la segunda mitad del siglo XVIII, e inmediatamente despertó un gran interés por sus posibles efectos terapéuticos. Priestley, en 1775, fue quien descubrió dicho gas que llamó "Aire de Fuego". Pero fue Lavoisier quien lo llamó oxígeno, él observó la rápida combustión de una vela y especuló que "la energía animal es consumida tan rápidamente a causa de esta tipo de aire puro". Más tarde, en 1789 Lavoisier y Sequin demostraron que el oxígeno a una presión de 1 atmósfera absoluta (ATA) no alteraba el metabolismo oxidativo, pero no describieron el efecto tóxico que éste tiene en los pulmones^{9, 10, 11}.

En 1878, Paul Bert publicó su trabajo pionero La Presión Barométrica¹² en la que presentó los resultados de años de estudio de los efectos fisiológicos de la exposición a altas y bajas presiones. Mostró que, aunque el oxígeno es esencial para la vida, es letal a altas presiones. Lasrks expuso que el aire a 15-20 ATA provoca

convulsiones, y el mismo efecto podía ser producido por el oxígeno a 5 ATA. Bert documentó convulsiones similares en otras especies, y estableció claramente la toxicidad del oxígeno sobre el sistema nervioso central (SNC), lo que actualmente se conoce como el Efecto de Paul Bert. Sin embargo no investigó el daño respiratorio.

En 1899, el patólogo J. Lorrain Smith estudió la neumonía letal que experimentó una rata después de una exposición a una atmósfera con el 73% de oxígeno. Sus trabajos se centraron en ratones y dio la primera descripción en detalle de los cambios pulmonares que se producían con exposiciones a altas tensiones de oxígeno durante prolongados periodos de tiempo. Smith fue consciente de las limitaciones que esta toxicidad producía en el uso del oxígeno en la clínica, así como que las alteraciones tempranas eran reversibles y que las más altas presiones acortaban el tiempo de aparición de dichas alteraciones. Las alteraciones pulmonares son también conocidas como Efecto de Lorrain Smith.

Aunque se han realizado numerosos estudios en animales, la evidencia de los efectos negativos del oxígeno a altas presiones en humanos, fueron escasas hasta la década de los años 30. En 1933, dos Oficiales de la Guardia Real Británica, Damant y Philips, respiraron oxígeno a 4 ATA, presentando síntomas convulsivos a los 13 y 16 minutos. Behnke después estudió una serie de exposiciones al oxígeno hiperbárico. Una exposiciones a 4 ATA desencadenaba en un sujeto un síncope agudo después de 43 minutos, y convulsiones a los 44 minutos en otro. A 3 ATA los efectos no se apreciaban hasta las 3 horas, pero a las 4 horas algunos sujetos presentaban nauseas y una sensación de colapso inminente. Así se consideró que exposiciones de 30 minutos a 4 ATA y de 3 horas a 3 ATA eran seguras para el resto de humanos.

Becker-Freyseng y Clamann, en 1939, descubrieron que exposiciones de 65 horas a 730 mmHg de oxígeno a presión atmosférica producía parestesia, náuseas, y una disminución de la capacidad vital. En 1941, Haldane describió una convulsión en menos de 5 minutos a 7 ATA de oxígeno.

Al comienzo de la Segunda Guerra Mundial, un número de episodios inexplicables de inconsciencia fueron descritos en buceadores que usaron equipos de circuito cerrado de oxígeno los cuales eran considerados seguros para las profundidades. Este hecho provocó que Donald, en 1942, comenzara una serie de experimentos sobre la toxicidad del oxígeno¹³, y sus observaciones en 2000 exposiciones formaron la base de los límites del oxígeno en el buceo. Desafortunadamente, algunos de estos trabajos fueron realizados usando equipos de circuito cerrado, sin medidas del dióxido de carbono. La mayoría de los más importantes descubrimientos marcaron la base en la variación de la tolerancia a este gas, los efectos agresivos del ejercicio y exposiciones subacuáticas. Sugirió que la profundidad máxima segura para bucear con oxígeno era de 8 metros.

Las investigaciones de los últimos 30 años han sido orientadas sobre todo a elucidar el mecanismo de esta toxicidad. Todos los esfuerzos para perfilar los límites pulmonares a las exposiciones han sido también establecidos. Esto ha tenido una importancia cada vez mayor en el buceo a saturación en el que el tiempo de permanencia en ambientes hiperbáricos se prolonga y se utilizan mezclas de oxígeno para acortar los tiempos de descompresión.

1. 3. Historia del Buceo Militar en España

Si nos remontamos a los orígenes de la Armada en España, parece evidente que su primera organización data del siglo XIII cuando la Fuerza Naval del Rey Fernando III, al mando del primer Almirante de Castilla D. Ramón Bonifaz, consiguió vencer al Rey moro Axafat y la rendición de Sevilla el 23 de noviembre de 1.248.

Con esta gesta el Rey encargó al Almirante Bonifaz la formación, organización y la redacción de las primeras ordenanzas realmente Castrenses de la Armada, toda vez que lo hasta entonces legislado se refería exclusivamente a las naves del comercio¹⁴.

A partir de este momento, se produce un significativo incremento del potencial Naval. En el siglo XIV, y debido a la necesidad de reparar las averías producidas por varadas, vías de agua, reparación de anclas, etc., se dota a los navíos españoles de buceadores a pulmón.

Durante los siglos XV y XVI se crea la Flota de corso y buceo para recuperar los galeones y cargamentos que habían naufragado en las Bahamas y golfo de México. Entre los siglos XVI y XVII comienzan a aparecer diversos ingenios, que permiten al hombre permanecer debajo del agua durante cortos intervalos de tiempo. Cabe destacar como los más importantes: Campana de Toledo, 1538, Campana de Bono, Trazas e Ingenios de Jerónimo de Ayanz 1597-1603, Equipo de Diego de Ufano 1613, Diseños de Pedro de Leresma 1623, Ingenio de Francisco Núñez Melian 1626, Campana de Cadaqués 1677, Campana del inglés Edmund Halley 1656-1742. El primer éxito técnico importante en esta campana, fue logrado por el físico y

astrónomo Sir Edmund Halley, quién observó el problema del agotamiento de oxígeno e ideó un sistema para enviar hacia abajo aire fresco en barriles^{15, 16}.

En 1775, Spalding, de Edimburgo, perfeccionó el aparato de Halley añadiendo a la parte superior de la campana una cámara provista de grifos que podía llenarse de agua para la inmersión, mientras que para emerger, el agua era expulsada. Nos hallamos ante un principio del lastre de agua que utilizan los submarinos actuales¹⁷.

En 1788 John Smeaton, construyó una campana a la cual se le suministraba mediante una manguera, aire de una bomba instalada en superficie. Esto representó una auténtica revolución técnica, produciendo la invención de muchos equipos de buceo¹⁸.

El primer equipo de Buceadores de Combate Españoles, constituido como tal, actuó, en 1782 minando el estrecho de Gibraltar a nado y al mando del general Grillón.

Por Real Decreto de 20 de febrero de 1787 se crean las primeras Escuelas de Buceo en cada Departamento Naval. Estas Escuelas de Buceo son las más antiguas del mundo.

En enero de 1791 Pedro Amable Burlet construye en Cartagena una maquina hidráulica para el buceo, útil para profundidades pequeñas.

El día 1 de julio de 1847, llega a Ferrol a bordo de la fragata mercante Jorge Juan el que puede considerarse el primer equipo de buzo para la Armada Española, modelo Siebe. La Armada Española adquirió el primer equipo Rouquayrol-Denayrouze en octubre del 1866, con destino a la Fragata Tetuán¹⁹.

Tanto la campana, la escafandra de Siebe, como el equipo de Rouquayrol-Denayrouze, eran alimentados con aire, hasta que en 1878 Henry Fleus patenta el

primer equipo de buceo autónomo, que empleaba oxígeno puro como medio respiratorio. Era a circuito cerrado con saco respiratorio, botella de oxígeno cargada a 30 Kg/cm². de presión, un cartucho que contenía el elemento purificador del anhídrido carbónico. Es el antecesor de los equipos que utilizan los buceadores de combate actuales.

Con todos estos modernos equipos de buceo es necesaria una nueva legislación, aprobándose el 20 de julio de 1904 el primer Reglamento de Buzos.

La primera cámara de descompresión que hubo en España, se adquirió en el año 1923 para la Armada y su Escuela de Buzos. La suministró la Siebe-Gorman y se instaló en 1924 a bordo de la barcaza auxiliar de buzos de la citada escuela. Esta cámara estuvo prestando servicio a la Armada el año 1979, estando actualmente expuesta en el Museo Naval de Cartagena²⁰.

También en 1926 llegan a España, las primeras tablas de descompresión inglesas, publicadas por el Dr. Haldane con la introducción de las citadas tablas y la primera cámara de descompresión importada igualmente de Inglaterra, se ponía punto y final a la aplicación de los procedimientos arcaicos utilizados para intentar mitigar los dolores y molestias producidas por los –ataques de presión–.

En 1928 se construye en Bilbao y se instala en Cartagena, en la base de submarinos, con material procedente de los sumergibles tipos, el primer tanque hidráulico para inmersiones de hasta 100 metros.

El primer equipo autónomo de oxígeno-nitrógeno y oxígeno puro se debe al Buzo Mayor de la Armada D. Pablo Rondón, denominado –Chaleco España– declarándose reglamentario en la Armada al efectuarse pruebas a 60 metros de profundidad y escapes desde submarinos posados en el fondo a 40 metros. En la actualidad los equipos de oxígeno puro se le denominan Equipos Autónomos de

Circuito Cerrado. Estos equipos se basan en la respiración de oxígeno puro y la regeneración del mismo mediante el efecto adsorbente del hidróxido de calcio o un producto semejante para el dióxido de carbono. La profundidad máxima que se puede alcanzar con estos equipos es de 8 metros, a causa del peligro de intoxicación por el oxígeno. Su característica de no emitir burbujas los hace especialmente adecuados para fines militares, siempre contando con su peligrosidad¹⁴.

Por decreto de 12 de marzo de 1942 se reorganiza el Cuerpo de Buzos de la Armada y en 1946 se construye una nueva Escuela, en la base de Submarinos de Cartagena. La segunda guerra mundial proveyó el incentivo necesario para que se avanzase a grandes pasos en el desarrollo de los equipos autónomos de circuito cerrado^{21, 22}.

En 1951, el español Santiago Ferrán trajo a España el primer equipo autónomo francés Aqualung (pulmón-acuático). En el año 1953 se crea el prestigioso C.R.I.S., (Centro de Recuperaciones e Investigaciones Submarinas) de Barcelona, uno de los primeros Centros Europeos de Actividades Subacuáticas y Deportivas, y a partir de 1967, se encuadran dentro de la F.E.D.A.S., (Federación Española de Actividades Subacuáticas).

Con el auge del buceo al final de la década de los 60 las instalaciones del CIB se quedan insuficientes, trasladándose el 3 de marzo de 1970 a la Estación Naval de la Algameca (Cartagena) a un edificio nuevo, que con el transcurrir de los años se irá convirtiendo en cuatro (Edificio de mando, con Complejo Hiperbárico, Escuela de buceo; Edificio de la UIS (Unidad de Investigación Subacuática) con complejo hiperbárico hasta 300 metros; Edificio del Cuartel de Marinería y Edificio de UEBC. A este conjunto de edificios y dependencias se le denomina Centro de Buceo de la Armada, creado por la O.M. 37/70 (D.O. núm. 11).

En la Escuela de Buceo del Centro de Buceo de la Armada, se imparten los cursos de Buceador Elemental, Buceador de Combate, Tecnología del buceo, Aptitud de Buzo, Accidentes de Buceo y Medicina Subacuática, cuya duración oscila entre dos meses y tres años. A estos cursos acuden Soldados y Marineros, Cabos, Suboficiales y Oficiales de las Fuerzas Armadas, Guardia Civil, Policía Nacional y numerosos alumnos de Marinas extranjeras, que acuden por el prestigio y solera de esta Escuela. Desde su inauguración, hasta el 31 de diciembre de 1999, la Escuela de Buceo ha formado unos 8.300 alumnos.

2. Biofísica del Oxígeno

Este gas es esencial para la vida ya que es empleado por el organismo para los procesos de oxidación y obtención de energía. Se encuentra en la atmósfera con una concentración del 21%.

Su principal limitación radica en su toxicidad, determinada por tres factores: presiones parciales elevadas, duración de la exposición²³ y susceptibilidad interindividual e intraindividual⁹. En la siguiente tabla se pueden observar los distintos rangos de presión parcial de O₂ y sus consecuencias sobre el organismo:

Tabla 1 Efectos fisiológicos del Oxígeno, en función de la presión.

Presión Parcial de Oxígeno	Efecto Fisiológico
< 0,17 ATA	Síncopes hipóxicos
Entre 0,17-0,4 ATA	Normoxia
Entre 0,4-1,7 ATA	Accidentes hiperóxicos pulmonares (efecto de Lorrain-Smith)
> 1,7 ATA	Accidentes hiperóxicos neurológicos (efecto de Paul-Bert)

En 1899 Lorrain-Smith fue el primero en concretar los efectos tóxicos del oxígeno sobre el pulmón, describiendo un cuadro de “Neumonía por oxígeno” y que también conocemos como síndrome de Lorrain-Smith⁹.

La exposición a presiones parciales de oxígeno superiores a 1,7 ATA, supone la aparición de un cuadro agudo de afectación neurológica descrito por el francés Paul Bert y que es responsable de la aparición de crisis convulsivas similares a las de un gran mal epiléptico²⁴.

Como consecuencia de sus problemas tóxicos se producen una serie de limitaciones en su uso para el buceo. En la Armada Española²⁵ el límite máximo de presión para el oxígeno, ya sea formando parte de una mezcla respiratoria o como único elemento respirable, se establece en 1,7 ATA²⁶.

Se ha determinado que en animales de experimentación la afectación pulmonar por oxígeno es tan importante que va a condicionar la supervivencia de los sujetos mas que la afectación de otros órganos y sistemas^{27, 28}. En humanos se manifiesta de forma aguda por alteraciones tanto en la mecánica ventilatoria como en los volúmenes y capacidades pulmonares²⁴ y si las exposiciones son muy prolongadas se produce la aparición de fibrosis intersticial y lesiones alveolares²⁹, atelectasias, edema pulmonar y daños estructurales en la producción y en la función del surfactante pulmonar³⁰.

3. Manifestaciones de la Intoxicación por Oxígeno

3.1. Signos y síntomas de toxicidad pulmonar por oxígeno

3.1.1. Efectos de la Intoxicación por Oxígeno In Vitro

Al igual que ocurre in vivo la intoxicación por oxígeno produce reacciones de inflamación con un flujo de células inflamatorias, células proliferativas e hipertróficas, un aumento de citoquinas, de la actividad apoptótica y subsecuentemente evidencias morfológicas de daño pulmonar. Las primeras 24 – 48 h de exposición de oxígeno constituyen la fase inicial de la intoxicación pulmonar por oxígeno^{31, 32}. Incluso lesiones de tipo no morfológicas han sido descritas durante esta fase.

Perkowski analizó 385 genes pulmonares durante los primeras horas de la exposición a hiperoxia (0-48 h). Observó que el oxígeno a elevadas concentraciones aumentaba la expresión de 175 y la disminuía en 210³³. Estos resultados indican que la fase inicial de las lesiones inducidas por la hiperoxia representa un complejo proceso que todavía está poco explicado. Determinadas investigaciones concluyen que en respuesta al estrés oxidativo, el número de células endoteliales descienden fuertemente en la fase post-inicial, mientras que las células epiteliales parecen ser relativamente resistentes al estrés oxidativo^{31, 34}. Además, se ha demostrado también que en respuesta a la ventilación hiperóxica se produce³⁵ enfisema³⁶, activación del sistema Fas/FasL³⁷, variaciones en la concentración de óxido nítrico y de peróxido de hidrógeno³⁸, síndrome de distrés respiratorio³⁹, aumento en la expresión total de la proteína pulmonar p53⁴⁰, las células alveolares tipo II son gravemente dañadas con probabilidad de culminar en muerte celular. Se ha descrito que tanto la apoptosis

como la necrosis podrían tener lugar en cultivos de células alveolares (principalmente epiteliales y endoteliales) durante exposiciones hiperóxicas. La respuesta al oxígeno in Vitro parece ser dependiente del tipo del cultivo aunque todavía no está claro el mecanismo o ruta de muerte implicada⁴¹.

Los neumocitos tipo II son muy importantes en el epitelio pulmonar. Ellos son las responsables del metabolismo del líquido surfactante. Los daños producidos en las células tipo II ocasionan alteraciones muy graves en la función pulmonar.

3.1.2. Efectos de la Intoxicación por Oxígeno In Vivo

Los efectos perjudiciales que produce el oxígeno a altas concentraciones en animales de experimentación son similares a los que aparecen en humanos por este motivo se toman como modelos en la mayoría de estudios científicos.

Se ha demostrado que en ratas adultas expuestas a concentraciones de oxígeno del 98% durante 0-24 h y 72 h sufren una respuesta inflamatoria pulmonar importante posiblemente a consecuencia de la gran infiltración de macrófagos que se produce y al aumento en la expresión de la E-selectina en la superficie endotelial del pulmón, sin embargo en ratas neonatales la tolerancia a la intoxicación es mayor^{42, 43, 44}.

En la intoxicación por oxígeno la barrera que antes se ve afectada es la alveolocapilar; en ella se alteran tanto las células epiteliales como las endoteliales a consecuencia de la degradación de la matriz^{45, 46}.

Las alteraciones por la hiperoxia también afectan a otras células además de las pulmonares como en leucocitos, cambios en la histología celular del riñón e ileon⁴⁷.

3.1.2.1. Influencia de la humedad en la intoxicación pulmonar por oxígeno In Vivo.

En cuanto a la influencia de los factores no determinantes ya sean invariables o variables, es dentro de éste último la humedad, el que más discusión ha planteado ya que mientras unos autores^{48, 49,50} hablan de la influencia directa en el daño pulmonar por hiperoxia, otros⁵¹ hablan de su inexistente relación, no apreciándose en humanos diferencias espirométricas antes y después de la exposición con oxígeno seco y húmedo.

3.1.3. Efectos de la Intoxicación por Oxígeno en Humanos

La intoxicación aguda por oxígeno debuta como síntoma más precoz con la aparición de una disnea subesternal⁵², consistente en unas molestias retroesternales en forma de quemazón que se intensifican con la inspiración profunda^{53, 54}, acompañada de tos ocasional que posteriormente se hace más frecuente. Las molestias se extienden por todo el árbol traqueobronquial instaurándose finalmente una disnea de reposo⁵⁵.

Gardette⁵⁶ atribuye la sensación de quemazón respiratoria a un estado de deshidratación de las vía aéreas superiores, de este modo sugiere que la utilización de humidificadores podría atenuar este síntoma. Winsborough⁵⁷ considera que el dolor sólo revelaría una traqueítis como respuesta inflamatoria a la hiperoxia. Barthelemy⁵³ observa la presencia de rinitis y conjuntivitis junto con la afectación traqueobronquial.

En individuos sometidos a una exposición a 3 ATA durante tres horas, la sintomatología no sólo fue respiratoria sino que aparecieron cuadros de ansiedad relacionada con la dificultad inspiratoria⁵⁸.

Las exposiciones prolongadas producen fiebre, estertores e hiperemia de la mucosa nasal⁹. Según Huber⁵⁹ estos estertores localizados en las bases pulmonares se pueden extender a todo el pulmón, apareciendo esputos hemoptóicos junto con disnea. Como efectos tardíos podemos destacar la presencia de anorexia, náuseas, vómitos y cefaleas que no remiten hasta 12-16 horas después del cese de la exposición⁵¹.

Desde el punto de vista radiológico observamos una alveolitis edematosa junto con imágenes condensantes basales que pueden confluir llegando a opacificar grandes áreas pulmonares. Estos signos radiológicos expresan la existencia de un edema intersticial y alveolar, atelectasias y membranas hialinas en espacios alveolares y vías aéreas terminales^{53, 59, 60}. Generalmente el cuadro clínico cede antes que las imágenes radiológicas, así podemos observar una normalización de los signos radiológicos en 48-72 horas⁶¹.

Clark⁶², considera que la coexistencia de toxicidad neurológica y pulmonar agrava esta última debido a la existencia de una broncoconstricción inducida por acción vagal, además durante la intoxicación neurológica por oxígeno puede producirse una incoordinación en la actividad respiratoria del diafragma⁶³.

3.1.3.1. Efectos de la Intoxicación por Oxígeno en los parámetros pulmonares

A) Afectación de la función pulmonar

La afectación de la mecánica ventilatoria se expresa como una disminución precoz de la elasticidad que según Deneke⁶⁴ dependerá tanto de la presión inspirada de oxígeno (PIO₂) como del tiempo de exposición.

Los estudios para observar la afectación en los volúmenes y capacidades pulmonares comenzaron en los años 70 cuando Clark y Lambersten⁶¹ tratan de

demostrar la validez de la afectación de la capacidad vital (CV) como índice de toxicidad pulmonar relacionando las variaciones de este parámetro con la PIO_2 y con el tiempo de exposición, de tal forma que en función del porcentaje de descenso de este parámetro se determinaba la gravedad de la afectación pulmonar y su potencial reversibilidad. En este sentido se propone la UPTD (Dosis Unidad de Toxicidad Pulmonar) que expresa el grado de lesión pulmonar ocasionado por la inhalación de oxígeno puro a 1 ATA durante 1 minuto y que se expresaría por la fórmula de Wright^{65, 66}.

$$UPTD = T \left(-1.2 \sqrt{\frac{0.5}{P - 0.5}} \right)$$

T = tiempo expuesto a la presión parcial de oxígeno

P = presión parcial de oxígeno

0,5 = presión parcial de oxígeno considerada segura para largas exposiciones: en la actualidad se considera que la presión parcial de oxígeno segura debe ser inferior a 0,5^{67, 68}

-1,2 = valor obtenido por Bardin, posteriormente Harabin consideró como más adecuado su disminución hasta 1,0⁶⁹.

Según la fórmula de Wright se sitúa el límite de toxicidad en 600 UPTD, así valores de 615 traerían consigo un descenso del 2% de la capacidad vital que según Clark se corresponden con la sintomatología inicial⁷⁰, siendo reversible y difícil de medir⁶⁵. Cifras de 1420 o 1425 UPTD producen un 10% de descenso en la capacidad vital así como síntomas pulmonares moderados (tos y dolor) y reversibles. Según Hendriks⁶⁷ esta sintomatología precedería en 1-2 horas a los cambios en la CV. La reducción del 10% está considerada como el límite superior tanto en operaciones de

buceo cómo en oxigenoterapia hiperbárica, de tal forma que descensos superiores al 10% provocan daños pulmonares irreversibles⁷¹, lo que parece contradecirse con lo expresado por otros autores que afirman que en situaciones de patología descompresiva grave puede ser aceptable una reducción de hasta el 20% de este parámetro⁶⁵.

Lemaire⁷², establece que la relación entre descenso de capacidad vital y toxicidad pulmonar por oxígeno no es satisfactoria cuando se emplean bajas presiones parciales de oxígeno durante largas exposiciones; Gardette⁷³ demostró que la relación establecida por Clark y Lambersten sí era válida para este tipo de exposiciones: observando descensos del 6% para una UPTD de 1000 y del 14% para valores de 1750.

Hyacinthe⁷¹, suscribe la validez de este parámetro y Eckenhoff⁷⁴ considera que es el único test de confianza para observar el comienzo y progresión de una toxicidad pulmonar. Clark⁷⁵ considera que su descenso es una manifestación fiable de toxicidad pulmonar tras exposiciones a una presión parcial de oxígeno igual o superior a 0.75 ATA siendo su recuperación más rápida que la de otros parámetros espirométricos.

Gardette⁵⁶, cuestiona su validez y señala que sus variaciones estarían condicionadas por las molestias respiratorias propias de la hiperoxia. Deneke considera que es un test de difícil reproducción interindividual e intraindividual⁶⁴. Adams⁷⁶ observa como los descensos más importantes de VC coincidían con las fases clínicas más floridas.

Lemaire⁷², empleó FVC como sustituto de VC, Widel⁵⁴ afirma que existe mayor afectación en FEV1 y Clark⁵⁸ revela descensos de FEV1 y FEF₂₅₋₇₅ tras

respirar oxígeno a 3 ATA durante 3.5 horas lo que sugiere afectación de pequeñas vías aéreas.

Crosbie²⁹, comprueba a su vez la reducción de FEV1 y FVC tras accidentes hiperóxicos pulmonares, aunque esta afectación fue reversible en el transcurso de algunas semanas, observando cómo la recuperación de FEV1 fue más lenta que la de FVC. Widell⁵⁴ sugiere que FEV1 tiende a mostrar mayores descensos que la capacidad vital (CV).

La afectación de los flujos medioespiratorios es según Crosbie²⁹ debida a la existencia de un estrechamiento de las vías aéreas de pequeño calibre o incluso un atrapamiento aéreo y Clark⁵⁸ correlaciona esta afectación con la presencia de un patrón obstructivo que se localizaría en los bronquiólos periféricos. Para confirmar esta hipótesis se realizan determinaciones de la conductancia específica de la vía aérea, observándose su alteración cuando se refiere a la vía de pequeño calibre comprobándose su integridad cuando se determina en vías aéreas de mayor calibre⁷⁵.

Crosbie²⁹, emplea flujos espiratorios considerando que su afectación es más importante y su retorno a valores pre-exposición es muy lenta llegando a superar incluso las 12 semanas. Thorsen⁷⁷ determina que la afectación de las vías aéreas de pequeño calibre se produce de forma previa a la afectación de la capacidad vital. Mialion⁷⁸ establece que los flujos medioespiratorios son fáciles de obtener y sensibles ante lesiones pulmonares leves, lo que según Reed⁷⁹ es compatible con un aumento de la distensibilidad y una reducción de la presión de recuperación pulmonar.

La afectación del factor de transferencia del monóxido de carbono (DLCo) es debida a la duración de la exposición y no a la presión parcial de oxígeno⁸⁰, su determinación manifiesta la respuesta individual de sujetos expuestos de forma

prolongada a presiones parciales de oxígeno consideradas sin efectos nocivos⁸¹. Su afectación no es inmediata⁵⁸ siendo su descenso prolongado en el tiempo, incluso varios días después de concluir la exposición hiperóxica; esta lenta recuperación es útil para comprobar la recuperación funcional del buceador⁵¹. Todos estos factores determinan que DLCo sea más sensible que la capacidad vital para objetivar la tolerancia pulmonar al oxígeno y su posterior evolución⁷³. El mayor inconveniente que plantea este parámetro es su dependencia entre otros del estado funcional de la barrera alveolocapilar y de la concentración y afinidad de la hemoglobina, todas estas circunstancias hacen según Lucas²⁴ seguir considerando a la capacidad vital cómo un parámetro con valor predictivo ya que es el único que se relaciona con la aparición de síntomas, siendo a su vez el más conocido y el más seguro.

Otros autores comprueban la existencia de gas etano, producto de la peroxidación lipídica, en el aire espirado tras la exposición hiperóxica⁸¹. Allen⁸² observa tras una exposición a oxígeno al 100% una elevación sanguínea de sustancias como noradrenalina o 5 hidroxitriptamina que traducen una afectación de las células endoteliales.

B) Tolerancia al Oxígeno

La toxicidad al oxígeno está condicionada por la presión parcial y por el tiempo de exposición^{55, 58, 83}. Barthelemy⁵³ cita los estudios de Clark y Lambersten que muestran como tras 30 días de exposición a una PIO_2 de 0,33 ATA no aparece ningún tipo de afectación pulmonar. Deneke admite que pueden respirarse concentraciones de oxígeno inferiores al 50% de forma indefinida sin causar lesiones pulmonares⁸³.

Thorsen³⁰, considera que una PO_2 de 50 Kpa no es tóxica pero su uso durante al menos dos semanas sí produce afectación pulmonar. Thorsen⁸⁴ realiza una exposición de larga duración a una PO_2 entre 40 y 50 Kpa, donde observó la existencia de mecanismos tóxicos acumulativos. Adams⁷⁶ observó cómo exposiciones a presiones parciales de 0,52 ATA no afectan a la salud del buceador, mientras que exposiciones a presiones parciales entre 0,53 y 0,83 ATA sí producían lesiones pulmonares. Lucas²⁴ considera que el daño pulmonar se establece más rápido y más intenso cuando la PIO_2 es superior a 1 ATA.

Otro factor que condiciona la tolerancia al oxígeno son las variaciones individuales⁷² que pueden condicionar respuestas distintas a igual presión y tiempo de exposición, esto puede estar relacionado con la capacidad individual para poner en marcha mecanismos antioxidantes, así se observan altas tasas de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en individuos con menos susceptibilidad a la acción tóxica del oxígeno^{65, 85, 86}.

Situaciones de estrés y trabajo físico favorecen la toxicidad de este gas, obteniéndose la máxima tolerancia en condiciones de reposo⁸⁷. Se ha demostrado que la combinación de ejercicio y oxígeno a 2.0 ATA está asociada a un incremento lineal de la presión arterial de CO_2 ⁸⁸. Este hecho a su vez está relacionado con el aumento del flujo sanguíneo cerebral entregando así una dosis mayor de oxígeno al cerebro^{89, 90}. En este sentido el tipo de exposición (continua o intermitente) cambia la susceptibilidad individual, lo que ha sido aprovechado para prolongar las permanencias en hiperoxia, ya que las exposiciones intermitentes previas a una exposición continuada retardan la aparición de los efectos tóxicos^{91, 92}. Ambos factores, reposo y exposición intermitente, son útiles en la aplicación de tratamientos

hiperbáricos⁹³, donde se favorece la síntesis de enzimas antioxidantes⁷⁷ y se duplica el tiempo necesario para inducir la aparición de una afectación pulmonar⁶⁷.

Otros factores ambientales importantes para conseguir mayor resistencia a la hiperoxia son la temperatura y el grado de humedad, de tal forma que una temperatura entre 20 y 25°C y valores del 70% de humedad relativa facilitan la máxima tolerancia⁸⁶. Arieli⁴⁸ observa en pacientes tratados diariamente con oxígeno húmedo una elevación de FEV1 frente a otros pacientes con oxígeno seco.

Smerz⁹⁴ tras realizar 998 tratamientos recompresivos tras accidentes de buceo establece que las mujeres son 2.8 veces más susceptibles de presentar toxicidad por oxígeno que los hombres.

La toxicidad por oxígeno disminuye si su respiración se hace asociada a un diluyente (nitrógeno o helio)⁹⁵.

En experimentación animal, Hammond⁹⁶ observa cómo el empleo conjunto de bloqueantes alfa adrenérgicos más el descenso periférico de catecolaminas tiene un efecto protector del daño pulmonar tras exposiciones hiperóxicas. Bitterman⁶³ considera que una dieta de beta carotenos durante una semana es el mejor procedimiento antioxidante y por tanto protector ante una toxicidad por este gas.

Sin embargo y pese a todas las medidas de protección, la respiración de oxígeno a altas concentraciones supone la producción de ROS (especies reactivas del oxígeno), que según Arieli^{97, 98} su nivel de producción es similar al desarrollo de los síntomas derivados de la toxicidad del oxígeno. Estos ROS afectarán de forma inmediata a las células más expuestas que son las células endoteliales y epiteliales de revestimiento alveolar que forman la barrera alveolocapilar (BAC).

3.2. Síntomas y signos de la intoxicación por oxígeno en el SNC

En un intento de identificar las manifestaciones preconvulsivas de la intoxicación por oxígeno en el SNC, Donald^{11, 13} expuso buceadores a presiones de oxígeno de 303 Kpa (3.0 ATA) hasta que aparecían importantes efectos neurológicos. Estos efectos incluían: palidez facial, sudor, bradicardia, sensación de asfixia, somnolencia, depresión, euforia, aprensión, cambios de comportamiento, síntomas visuales, síntomas acústicos, cambios respiratorios, náuseas severas, vómitos espasmódicos, vértigo, temblor de labios, contracciones de pecho y nariz, palpitaciones, tensiones epigástricas, síncope y convulsiones. Desafortunadamente, la secuencia de la progresión de dichos síntomas y signos no incluye síntomas leves antes de la aparición de las convulsiones.

3.2.1. Ataques Hiperóxicos

El ataque causado por la intoxicación de oxígeno se presenta como una convulsión tónica-clónica generalizada⁹⁰. Suele ocurrir sin previa advertencia o precedida por una secuencia de sensaciones premonitorias. La aparición de la convulsión consiste en una fase tónica rígida con pérdida abrupta de conciencia y una fuerte rigidez en el cuello y las extremidades. En este tipo de ataques es importante la apertura parcial de la boca y la inserción de cualquier dispositivo que evite que el paciente se muerda la lengua. La fase tónica es seguida de unos 30 segundos aproximadamente de una fase clónica de poderosas y repetidas contracciones de casi todos los músculos del organismo durante 1 minuto antes de que desaparezcan gradualmente. Un periodo apnéico persiste a lo largo de toda la fase tónica y clónica. A continuación aparece una hiperventilación vigorosa estimulada por la retención de dióxido de carbono y la acidosis metabólica. Si el oxígeno ha sido respirado de forma

discontinua, la conciencia se recupera en pocos minutos después la convulsión es seguida de 5-30 minutos de recuperación gradual de la lucidez mental. Sin embargo en la hipoxia cerebral que tiene lugar durante un ataque epiléptico, la hiperoxigenación del cerebro es mantenida durante una convulsión oxigénica por una elevada PO_2 en conjunción con una marcada hipercapnia e incremento del flujo sanguíneo cerebral.

Se ha demostrado que, salvo los riesgos asociados a una lesión física o a un ahogamiento, una sola convulsión producida por el oxígeno no desencadena daño ni efectos secundarios^{13, 90, 99}.

La marcada exacerbación de los síntomas neurológicos, incluyendo las convulsiones, han sido observadas en los primeros minutos de respirar aire después de la exposición hiperóxica^{13, 90, 100}. Un buceador que respira oxígeno a altas presiones ya sea por terapia o descompresión, crea un riesgo ya que el oxígeno puede inducir un ataque. Podría ocurrir un embolismo por aire letal a menos que se interrumpiera la descompresión inmediatamente y la presión ambiental fuese constante hasta que se instaure la respiración normal.

3.2.2. Cambios en la Actividad Eléctrica Cerebral

El electroencefalograma proporciona una medida objetiva de la actividad eléctrica del cerebro. Es la prueba que se utiliza como indicador de la intoxicación por oxígeno en el SNC^{101, 102}. Algunos autores encontraron que, mientras que el ataque en sí mismo estaba asociado con descargas eléctricas generalizadas, la actividad del encefalograma no era modificada antes del evento. Lambertsen¹⁰³ monitorizó a 18 sujetos expuestos a 303 Kpa (3.0 ATA) de oxígeno durante 3.5 h y evidenció en uno de los sujetos cambios en la actividad eléctrica cortical del cerebro

antes de un episodio sincopal hipotensivo y en otro advirtió las típicas convulsiones ocasionadas por el oxígeno.

Torbati¹⁰⁴ estudió la actividad electrocortical cerebral en el despertar de ratas expuestas a 303 Kpa, 404 Kpa y 505 Kpa (3,0, 4,0 y 5,0 ATA) de oxígeno. Observó cambios significativos en la actividad de bandas individuales por encima de los 60 minutos antes de que aparecieran las descargas eléctricas prominentes que preceden a los ataques generalizados. Sin embargo, Visser¹⁰⁵ no encontró cambios significativos entre el análisis espectral del encefalograma realizado a un buceador con convulsiones después de respirar oxígeno durante 30 min a una presión de 238 Kpa (2,8 ATA) y el resto de pruebas de sus compañeros que no presentaron ningún síntoma o signo de intoxicación por oxígeno en el SNC.

3.3. Efectos Tóxicos del Oxígeno en el Ojo

Behnke¹⁰⁶ observó una pérdida progresiva de la visión periférica hasta el punto de ceguera total en un sujeto que respiró oxígeno a 3,0 ATA durante 3,5 h. El cambio fue reversible y en 50 min recuperó la visión completa tras reanudar la respiración con aire.

Una extrema susceptibilidad a la pérdida visual durante exposiciones hiperóxicas se encontró en un individuo que se había recuperado hacía unos años de una neuritis retrobulbar en un ojo¹⁰⁷.

Un similar grado de susceptibilidad visual con respecto a la intoxicación por oxígeno fue observada en un buceador que experimentó una pérdida progresiva en la visión periférica, más extendida en el ojo derecho que en el izquierdo, durante un periodo de descompresión de 1 h de 3,0 ATA a 2,0 ATA¹⁰⁸. El campo visual fue recuperado tras 40 min respirando aire.

La hiperoxia también afecta a la actividad eléctrica retinal. Noell^{109, 110} y Bridges^{111, 112} mostraron en conejos los efectos de una exposición prolongada de hiperoxia en un electroretinograma, medido como respuesta eléctrica que experimenta la retina en oscuridad y en un flash de luz. La amplitud del electroretinograma fue inhibido total e irreversiblemente por exposiciones hiperóxicas cercanas a los 2 días de 1,0 ATA y de 1 día a 7,0 ATA. La recuperación de la amplitud del electroretinograma no tenía lugar si la exposición a oxígeno continuaba más allá del tiempo de extinción completa, presumiblemente hasta el punto de daño o muerte visual^{107, 110}.

Los descensos reversibles en la amplitud del electroretinograma han sido observados en sujetos sanos durante exposiciones prolongadas de oxígeno a presiones de 3,0, 2,5, 2,0 y 1,5 ATA^{103, 113, 114}. Sin embargo existe poca correlación entre el electroretinograma y el campo visual por lo que los efectos de la intoxicación por oxígeno en el ojo podrían tener distintos sitios de acción o características bioquímicas en el desarrollo celular^{113, 114}.

La exposición a una atmósfera hiperoxica ocasiona miopía progresiva. Burtler¹¹⁵ publicó un caso en el que un buceador respiró oxígeno puro con un equipo de circuito cerrado, desarrolló 1,5 dioptrías de miopía. La causa de la miopía progresiva inducida por hiperoxia ha sido atribuida a un cambio reversible en la forma o metabolismo de la lente ocular^{116, 117, 118}. Otras posibles causas de la miopía podrían ser cambios en la curvatura corneal o tensión intraocular¹¹⁹ y cambios en la longitud axial del ojo¹²⁰. En pacientes diabéticos y ancianos la incidencia de aparición de miopía es más alta¹¹⁸.

Los resultados en animales de experimentación también indican que los efectos oculares por la toxicidad de oxígeno podrían ser más severos cuando el ojo

entero está expuesto a la atmósfera hiperoxica que cuando la hiperoxigenación ocurre sólo en la circulación arterial¹²¹.

3.4. Otras Manifestaciones de la Toxicidad por Oxígeno

Aunque hemos dado más importancia a los daños ocasionados por el oxígeno en el sistema pulmonar, en el SNC y en el ojo, todos los órganos y tejidos del cuerpo son susceptibles al daño que producen altas concentraciones de oxígeno. Sin embargo no se han detectado alteraciones en órganos tan irrigados como el corazón, el riñón o el hígado. Es posible que las lesiones en el SNC y en los pulmones precedan a las manifestaciones en el resto de órganos.

3.4.1. Sistema Hematopoyético

Se ha demostrado que el oxígeno tiene efectos deletéreos sobre los eritrocitos que se manifiestan en alteraciones en la morfología y/o descensos circulatorios de la masa eritrocitaria. Esto puede deberse a una inhibición de la eritropoyesis, inactivación de enzimas glucolíticas esenciales o daño en las membranas de las células rojas resultado de una peroxidación de los lípidos de membrana. Estudios en ratones muestran daño irreversible en las células madre hematopoyéticas tras 24 horas de exposición a oxígeno 100%⁹.

3.4.2. Vasoconstricción

Otras alteraciones que se presentan a causa de la vasoconstricción inducida por la hipoxia son el fenómeno de Raynaud, es una afección en la cual las temperaturas frías o las emociones fuertes causan espasmos vasculares que bloquean el flujo sanguíneo a los dedos de las manos y de los pies, las orejas y la nariz, la

enfermedad de Buerger, esta enfermedad afecta a los vasos sanguíneos de manos, brazos, piernas y pies, haciendo que se hinchen e impidiendo la circulación de la sangre, y migrañas. El riesgo de obstrucción del lecho arterial ha sido estudiado en fetos expuestos a concentraciones de oxígeno elevadas⁹.

3.4.3. Oído

En pilotos expuestos a altas concentraciones de oxígeno se han producido otitis medias graves, esto podría estar ocasionado por la absorción de oxígeno del oído medio. Un síndrome relacionado con el oído medio ha sido descrito por buceadores de la Marina Americana que respiraban 100% de oxígeno con equipos de circuito cerrado o semi-cerrado.

4. Mecanismos de Daño Oxidativo y Defensas Antioxidantes

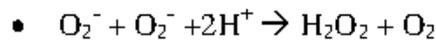
4.1. Especies Reactivas de Oxígeno

Un radical libre está definido como una molécula o átomo que contiene uno o más electrones desapareados en su última capa¹²⁰. La presencia de electrones desapareados los convierte en especies altamente reactivas. La vida media de varios radicales es sólo una fracción de segundo, aunque hay una considerable diferencia según del radical del que se trate¹²¹. Los radicales más importantes en los sistemas biológicos son el anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH^\cdot), óxido nítrico (NO^\cdot), radicales derivados de la peroxidación lipídica (ROO^\cdot) y el radical alcoxil (RO^\cdot).

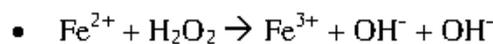
El término “especies reactivas de oxígeno” (ERO) es a menudo utilizado para referirse tanto a los radicales libres como a otros compuestos reactivos relacionados

con el oxígeno, como el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y los hidroperóxidos (ROOH)¹²⁰. Todos estos compuestos tienen la capacidad de formar nuevos radicales libres¹²¹. Cuando un radical libre reacciona con una molécula que no lo es, la molécula diana se convierte en un radical, que a su vez reaccionará con otra molécula y así sucesivamente.

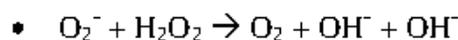
La principal fuente de producción de ERO es la reducción del oxígeno formando O_2^- ^{120, 121, 122}. Aunque la reactividad de O_2^- es bastante baja, es capaz de iniciar la cadena de reacciones. El anión superóxido experimenta un cambio para transformarse en H_2O_2 espontáneamente o enzimáticamente (I). La tasa de dismutación espontánea es baja, mientras que la reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) es 10^4 veces más rápida^{120, 121}. Este radical también puede reaccionar con el óxido nítrico (NO^\cdot) para formar peroxinitritos (ONOO^-)¹²³.



El peróxido de hidrógeno es más estable que el O_2^- . Puede difundir a través de las membranas plasmáticas. El radical más reactivo y potencialmente dañino ha sido considerado el OH^\cdot ¹²⁰ aunque la vida media del OH^\cdot es extremadamente corta. El radical hidroxilo se forma en la reacción de Fenton catalizada por la transición de iones metálicos o cobre a partir del H_2O_2 (II):



Otra reacción que produce el radical hidroxilo es (III):



4.2. Fuentes de Especies Reactivas de Oxígeno en el Pulmón

Las especies reactivas de oxígeno son generadas en el metabolismo normal de todas las células aerobias. Las células pulmonares son las primeras en encontrarse

con el oxígeno inspirado, y la concentración de este gas en el pulmón es más alta que en cualquier otro órgano. Los descubrimientos fundamentales en la producción de ROS en células pulmonares se han realizado mayoritariamente en pulmones de ratas, conejos y en macrófagos alveolares humanos¹²⁴. La producción de ROS aumenta como resultado de un incremento en la concentración de oxígeno o de los oxidantes exógenos como el ozono, el humo de cigarrillos, asbestos, fibras, radiaciones y determinadas drogas^{125, 126, 127, 128}. La síntesis de superóxido en la cadena de respiración mitocondrial está asociada con la NADH deshidrogenada y el complejo ubiquinona/citocromo b¹²⁵. Los estudios de un incremento en la producción de ROS por la mitocondria tras la exposición a hiperoxia sugieren que las mitocondrias son una importante fuente de producción de ROS en el pulmón^{125, 129}. La síntesis de superóxido es más alta cuando el funcionamiento de la cadena respiratoria localizada en la membrana interna mitocondrial es fuertemente reducida¹²⁵. El H₂O₂ mitocondrial es principalmente obtenido de la dismutación del O₂⁻. Aproximadamente del 1-2% del oxígeno consumido por la mitocondria es transformado en O₂⁻ y H₂O₂.

El citoplasma celular es también una importante fuente de producción de ROS. Una fuente no enzimática de ROS es la síntesis de OH⁻ por las reacciones catalizadas por iones (reacciones de Fenton y Haber-Weiss), además los ROS son formados por enzimas intracelulares. La Xantina oxidasa (XO) es un enzima citoplasmático que bajo condiciones normales se encuentra en su forma deshidrogenada siendo la producción de ROS casi despreciable. En tejidos isquémicos, se transforma en su forma oxidada, aumentando la producción de O₂⁻ y de H₂O₂ durante la reoxigenación¹³⁰. Pero los niveles de XO en los tejidos pulmonares son bajos, por lo que su papel en la producción de ROS en el pulmón es

probablemente insignificante¹³¹. Los neutrófilos contienen mieloperoxidasa que convierte el H_2O_2 a ácido hipocloroso (HOCl), un oxidante de larga vida media¹²⁰. Otras fuentes de producción relevante de ROS en el pulmón son los enzimas citocromos P-450 y las oxidasas peroxisomales.

Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante en la defensa del organismo frente a los microorganismos patógenos. Durante la fagocitosis, las células inflamatorias activadas generan ROS por medio del NADPH oxidasa unida a membrana¹³².

4.3. Comparación de Producción de ROS entre Varios Tipos de Células en el Pulmón

Las fuentes más importantes y la cantidad de producción de ROS varían entre especies y órganos. Aunque la comparación de la producción de ROS entre células es difícil, algunos estudios han cuantificado la síntesis de ROS en varios tipos celulares en el pulmón. La cantidad de H_2O_2 liberada por neutrófilos es más alta que la liberada por monocitos¹³³. Los macrófagos alveolares de rata liberan H_2O_2 en una tasa de 3,1 nmol/min/mg, los neumocitos tipo II de rata lo hacen a 0,7 nmol/min/mg, y cultivos de células endoteliales, 0,06 nmol/min/mg¹³⁴. Las células del mesotelio pleural de rata producen una cantidad menor de H_2O_2 extracelular (menos de 0,1 nmol/min/mg)¹³⁵.

La exposición a hiperoxia aumenta la formación de ROS en homogenados de pulmón de rata, en mitocondrias pulmonares aisladas de rata y en macrófagos alveolares de este mismo animal^{136, 137, 138, 139}. La síntesis de H_2O_2 por células endoteliales vasculares de bovino es dependiente de la concentración de oxígeno. Mitocondrias y microsomas pulmonares de ratas adultas producen más ROS que

organelas aisladas de pulmones neonatales, indicando esto que la producción de ROS es dependiente de la edad¹⁴⁰.

4.4. Efectos de las Especies Reactivas del Oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno son potencialmente dañinas, ya que interactúan con cualquier biomolécula de la célula modificando sus características. La peroxidación lipídica es una cadena de reacciones mediada por radicales que es iniciada por un átomo de hidrógeno procedente de los lípidos poliinsaturados¹²⁰. El radical hidroxilo, ROO[•], RO[•] y algunos complejos de iones, pero no O₂⁻ o H₂O₂ son lo suficientemente reactivos como para iniciar la peroxidación lipídica. Una excesiva peroxidación en los lípidos de membrana altera la disposición de la bicapa, disminuye la fluidez, aumenta la permeabilidad y se modifican las proteínas unidas a la membrana.

Los ROS pueden incluso dañar el DNA, las proteínas y los carbohidratos. Los radicales inducen rupturas en las hebras de DNA así como la oxidación de las bases púricas y pirimidínicas, produciendo un incremento de la frecuencia de mutaciones¹²⁵. La presencia de hebras rotas de DNA activa la polimerasa poli-ADP-ribosa, un enzima reparador, que consume NAD, ATP y altera el balance de energía^{141, 142}. Además, los ROS pueden activar o inactivar proteínas oxidando los grupos sulfhidrilos y modificando los aminoácidos^{143, 144}.

Cuando el estrés oxidativo es severo se produce peroxidación lipídica, oxidación proteica, daño en DNA y agotamiento de ATP. Todos estos fenómenos conducen a la muerte celular por necrosis, caracterizada por desestabilización de las membranas celulares y las organelas. Otro posible mecanismo de muerte celular es la apoptosis, un complejo mecanismo de suicidio celular. Se ha destacado que los ROS

y los cambios en el estado redox de la célula, especialmente en la mitocondria, juegan un papel importante en la regulación y en la iniciación de reacciones íntimamente asociadas con la apoptosis^{145, 146}.

Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en los efectos dañinos de los ROS también poseen unos efectos beneficiosos en la célula. La importancia de los ROS como un mecanismo de defensa frente a los microorganismos ha sido ampliamente demostrada. El NO⁻ actúa como un factor relajante en el endotelio vascular¹⁴⁷. Además, los ROS juegan un papel crítico en la regulación redox en la expresión de genes¹⁴⁸ y en el crecimiento y proliferación celular¹⁴⁹.

4.5. Regulación de la Actividad Sintasa de Óxido Nítrico en Respuesta a la Hiperoxia

La hiperoxia puede alterar la concentración de NO⁻ in vivo. Sin embargo, los datos no terminan de coincidir en si los niveles de NO⁻ aumentan o disminuyen. La mayoría de estudios indican que el oxígeno hiperbárico aumenta la síntesis de NO⁻, pero su metabolismo básico aún no es conocido completamente. Los cambios en el Ca⁺⁺ podrían jugar un papel en la síntesis del NO⁻ en respuesta a la hiperoxia. La toxicidad en el SNC por oxígeno puede ser disminuida con un inhibidor de la óxido nítrico sintasa, pero todavía no está claro si esto se debe a la reducción de la concentración de NO⁻ o simplemente a un menor consumo de O₂ causado por la disminución del flujo sanguíneo cerebral^{150, 151, 152, 153}. Ratas expuestas a una presión parcial de oxígeno de 5.0 ATA aumentaban la concentración de Ca⁺⁺ intrasinaptosomal lo que de forma secundaria incrementa la actividad de la óxido nítrico sintasa¹⁵⁴. La toxicidad por oxígeno fue inhibida por un inhibidor de la óxido nítrico sintasa y por un bloqueador de los canales de Ca⁺⁺. Estos datos sugieren que

la hiperoxia es el detonador de la elevación de la síntesis de NO^- porque altera los niveles de Ca^{++} intracelular, aunque otros mecanismos también son posibles. Ito ¹⁵⁵, especula con el oxígeno hiperbárico opinando que podría promover la síntesis de NO^- ya que se inhibe aparentemente la actividad arginasa en el cerebro y porque el peróxido de hidrogeno acelera la síntesis de NO^- . Varias investigaciones han propuesto que el peróxido de hidrógeno podría aumentar la tasa de reacción del segundo paso de la óxido nítrico sintasa; la conversión de N-hidroxi-L-arginina a citrulina y NO^- , pero esta cuestión no está bien establecida^{156, 157}. Si in vivo la concentración de la superóxido dismutasa aumenta por el oxígeno hiperbárico, la producción de NO^- está elevada debida a la síntesis del peróxido de hidrógeno. Sin embargo, se ha observado que la superóxido dismutasa logra este efecto por la disminución del anión superóxido, así aumenta la vida media del NO^- ^{158, 159}. Demchenko¹⁶⁰ observó un complejo equilibrio entre la síntesis y destrucción de NO^- mediado por la hiperoxia.

Se conocen tres isoformas para la producción de NO^- incluyendo la sintasa de NO^- neuronal (nNOS, tipo I), la sintasa de NO^- inducible (iNOS, tipo II) y la sintasa de NO^- endotelial (eNOS, tipo III). Las dos isoformas constitutivas nNOS y eNOS pueden ser inducidas por determinados factores ambientales¹⁶¹. La tipo II es constitutivamente expresada en algunos tipos de células gliales, miocitos y células epiteliales, su síntesis es inducible en algunos tipos de células por una variedad de citoquinas y lipopolisacáridos^{162 163}. Las tres formas requieren de L-arginina, O_2 y NADPH como co-sustratos, FAD, mononucleótido flavina, tetrahidrobiopterina, y como cofactores grupo hemo y no-hemo¹⁶⁴.

La actividad de la nNOS y de la eNOS está controlada por variaciones en la concentración de Ca^{++} intracelular y por lo tanto a la unión a calmodulina, mientras

que la iNOS une débilmente calmodulina no estando este proceso regulado por el Ca^{++} . Todas estas isoformas se unen a caveolinas. La caveolina es la proteína predominante en estructuras membranosas especializadas y hay tres isoformas de caveolina^{162, 165}. Cuando los agonistas como la acetilcolina o la bradiquinina se unen a receptores de membrana, elevan el Ca^{++} intracelular el cual a su vez activa a la nNOS y a la eNOS¹⁵⁹. Algunos datos indican que al menos para la eNOS este proceso implica una disociación de Ca^{++} del enzima desde la caveolina, lo que se continúa con una unión a la calmodulina produciéndose la síntesis del NO ¹⁶⁶.

Estudios con enzimas óxido nítrico sintasas aisladas indican que sus actividades están influenciadas por el estado redox y específicamente por la tensión O_2 .

Trabajos realizados con sistemas celulares intactos presentan resultados dispares con respecto a la influencia del O_2 en la síntesis de la óxido nítrico sintasa. El endotelio vascular de la aorta fue estudiado en cultivo bajo niveles máximos de Ca^{++} y se observó que la síntesis de NO^- ocurría con una presión de oxígeno de 38 mmHg. La producción pasó a ser máxima cuando las células fueron incubadas a 145 mmHg de O_2 con un pequeño incremento cuando se aumentó la tensión al 100% (93 mmHg)¹⁶⁷. Una diferencia en el comportamiento con respecto al O_2 en las células del endotelio vascular de pulmón fue encontrado cuando el Ca^{++} no fue manipulado. De nuevo utilizando cultivos, se apreció una elevación significativa de la síntesis cGMP cuando la presión parcial de oxígeno aumentó de 40 a 150 mmHg, siendo la producción aún mayor bajo condiciones hiperóxicas normobáricas. (PO_2 91 kPa; 680 mmHg)¹⁶⁸. Sin embargo, estos cambios no se apreciaron en el endotelio mesentérico, podría existir la posibilidad de que el aumento en la síntesis de NO^- mediado por el oxígeno sea un fenómeno exclusivo del endotelio pulmonar.

Estudios en animales y en humanos han proporcionado una mayor claridad en la influencia del oxígeno en la producción de NO[•] en el pulmón. Muchos investigadores han propuesto que los aumentos en la producción de NO[•] en el endotelio pulmonar inducidos por el oxígeno, podría ser la base de la dilatación de los vasos pulmonares^{169, 170}.

Evidencias indirectas basadas en mediciones de flujo mostraron que la vasoconstricción mediada por el O₂ aumentó con inhibidores de la óxido nítrico sintasa pero otros estudios no encuentran este efecto^{160, 171, 172}.

4.6. Interacciones con Membranas Plasmáticas

La membrana plasmática es un de los lugares de acción más importantes de los radicales libres más importantes. Se pueden dar varios tipos de daños con una variedad de consecuencias funcionales. Una serie de radicales libres adicionales así como algunas moléculas biológicas pueden ser producidas por enzimas unidas a la membrana¹²⁵. La peroxidación lipídica se conoce como el daño producido por los radicales libres en las membranas lipídicas. Fenómenos como la peroxidación de ácidos grasos insaturados de membrana, la oxidación de estructuras proteicas y la inactivación de enzimas de membrana pueden aumentar la permeabilidad de las membranas y eliminar los gradientes transmembrana de iones. Esto conlleva la pérdida del fenómeno de la secreción y otras funciones importantes de la membrana.

4.6.1. Peroxidación Lipídica

Las membranas celulares son ricas en ácidos grasos poliinsaturados que pueden actuar con radicales libres para generar peróxidos lipídicos y radicales peroxil lipídicos los cuales generan unas reacciones tóxicas similares a las que

provocan las especies reactivas de oxígeno^{125, 173}. Este proceso es potenciado por la presencia de metales y puede convertirse en autocatalítico tras la iniciación para amplificar el daño oxidando ácidos grasos poliinsaturados.

La naturaleza hidrofóbica de los radicales lipídicos favorecen que se produzcan más fácilmente estas reacciones oxidativas que tienen lugar en las membranas plasmáticas. El resultado de la peroxidación de los ácidos grasos de membrana podría tener efectos adversos en la permeabilidad y viscosidad de la membrana. Además, la polimerización de los componentes de la membrana causada por el malondialdehído, producido por la peroxidación de los ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, puede alterar las propiedades fundamentales de la membrana como es la deformabilidad, el transporte de iones y las actividades enzimáticas¹²⁵.

La peroxidación lipídica inducida por la hiperoxia ha sido estudiada en muestras corticales de cerebro de rata^{174, 175} y relacionada con la inactivación parcial de la NaK-ATPasa¹⁷⁶. En ratones las convulsiones provocadas por el oxígeno aparecen antes que en ratas, este hecho está asociado con los niveles más elevados de peroxidación lipídica en las muestras corticales de ratones¹⁷⁴.

Se ha observado que el Fe²⁺ potencia la peroxidación lipídica inducida por hiperoxia en rodajas corticales del cerebro¹⁷⁶ además de existir una relación lineal entre el grado de la peroxidación lipídica y el contenido de hierro endógeno en homogenados de diferentes áreas del cerebro¹⁷⁷.

La peroxidación lipídica durante la hiperoxia ha sido identificada también en pulmones e hígado¹⁷⁸. Las tasas de peroxidación lipídica en pulmones de ratas normales y deficientes en tocoferol aumentaron un 50% y un 500% respectivamente, durante la exposición de presiones de oxígeno de 4 ATA¹⁷⁹. Exposiciones de 80-

100% durante 2-7 días también incrementa la tasa de peroxidación lipídica en tejidos pulmonares^{137, 180, 181}.

4.7. Defensas Antioxidantes

Las defensas bioquímicas contra los radicales libres derivados del oxígeno son esenciales para poder sobrevivir en un ambiente aeróbio^{182, 183, 125, 173}. Fridovich¹⁷³ caracterizaron las defensas antioxidantes como un sistema encargado de oponerse a la amenaza que supone las especies reactivas de oxígeno producidas a partir de la reducción univalente de una molécula de oxígeno. La primera línea de defensa de este sistema es evitar la ruta de reducción univalente del oxígeno por medio de la acción de los enzimas como la citocromo oxidasa, que puede reducir el oxígeno molecular a agua sin producir intermediarios reactivos. La óxido nítrico sintasa mantiene la transferencia de la pareja de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, dentro de las proteínas citosólicas que catalizan diferentes reacciones de oxidación. Este enzima previene la transferencia de electrones del oxígeno.

4.7.1. Superóxido Dismutasa

La segunda línea de defensa es la que proporcionan las metaloproteínas, como las superóxidos dismutasas, que catalizan la dismutación del anión superóxido a la forma peróxido de hidrógeno^{125, 173}. Algunas superóxidos dismutasas se unen en el citoplasma de las células de mamíferos al cobre y al zinc divalentes en sus centros activos, mientras que el manganeso ocupa los centros activos de otras superóxidos dismutasas unidas a la matriz mitocondrial.

La importancia de la superóxido dismutas como un componente del sistema antioxidante fue reconocida y documentada por McCord¹⁸⁴. Las superóxidos

dismutasas han sido encontradas en todos los organismos aeróbicos, pero no en los anaeróbicos¹⁸⁵. Se ha demostrado un aumento de la síntesis de la superóxido dismutasa inducido por el incremento en la producción intracelular de radicales superóxidos^{186, 187}. Las concentraciones intracelulares de superóxido dismutasa fueron correlacionadas con la resistencia a la toxicidad por oxígeno^{186, 187, 188}, mientras que mutantes con niveles deficientes de superóxido dismutasa fueron susceptibles a la intoxicación por oxígeno¹⁸⁹.

4.7.2. Glutation Peroxidasa

La tercera línea de la defensa antioxidante la proporciona la glutacion peroxidasa y la catalasa, que eliminan el peróxido de hidrógeno producido indirectamente por la dismutación del anión superóxido o directamente por la reoxidación de flavo-enzimas reducidas¹⁷³. La glutacion peroxidasa puede reducir el peróxido de hidrógeno a agua, se trata de un enzima que contiene selenio en su centro activo. La depleción de glutacion reducido se evita por la acción de la glutacion reductasa, que cataliza la reducción de glutacion disulfuro con oxidación de NADPH.

4.7.3. Óxido Nítrico y Peroxinitritos

Se identificó una NO⁻ reductasa bacteriana capaz de eliminar el NO⁻ en bacterias^{190, 191}. Todavía no se ha encontrado su equivalente en mamíferos. La glutacion peroxidasa dependiente de selenio podría servir como una peroxinitrito reductasa, y como una selenoproteína P que funcionaría como sumidero en las células de mamíferos^{192, 193}. Se ha visto que determinados enzimas específicos

eliminan los aminoácidos nitrados preservando todavía la estructura de proteína pero aún no ha sido ni caracterizada ni purificada.

4.7.4. Inversión del Daño Oxidativo

La reactivación de enzimas oxidados y la reducción de los componentes titulares oxidados constituyen la quinta y última barrera de defensas antioxidantes¹⁷³. Estos procesos de reparación parecen culminar con las interacciones del glutathion reducido y oxidado^{194, 195}. Se ha obtenido in Vitro una elevación del turnover de la glutathion en respuesta a un incremento de la PO_2 en preparaciones de vejigas de rana¹⁹⁶ y en preparaciones de pulmón aislado¹⁷⁹.

La producción de glutathion reducido requiere la presencia de NADPH, que es recuperado en la ruta de las pentosas del metabolismo glucídico¹⁹⁷. El contenido total en pulmón de la enzima limitante de la ruta de las pentosas, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en ratas adaptadas a la hiperoxia está aumentada^{198, 199}. La actividad del ciclo de las pentosas está también incrementada en pulmones de rata ventilados con O_2 a 5,0 ATA²⁰⁰. La implicación del ciclo de las pentosas en la inversión del daño oxidativo en el cerebro así como en el pulmón está representado por pequeños cambios en la actividad del ciclo de las pentosas o en una reducción del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en cortes de cerebro de rata²⁰¹ y en tejido retinal expuesto a presiones hiperbáricas de oxígeno²⁰².

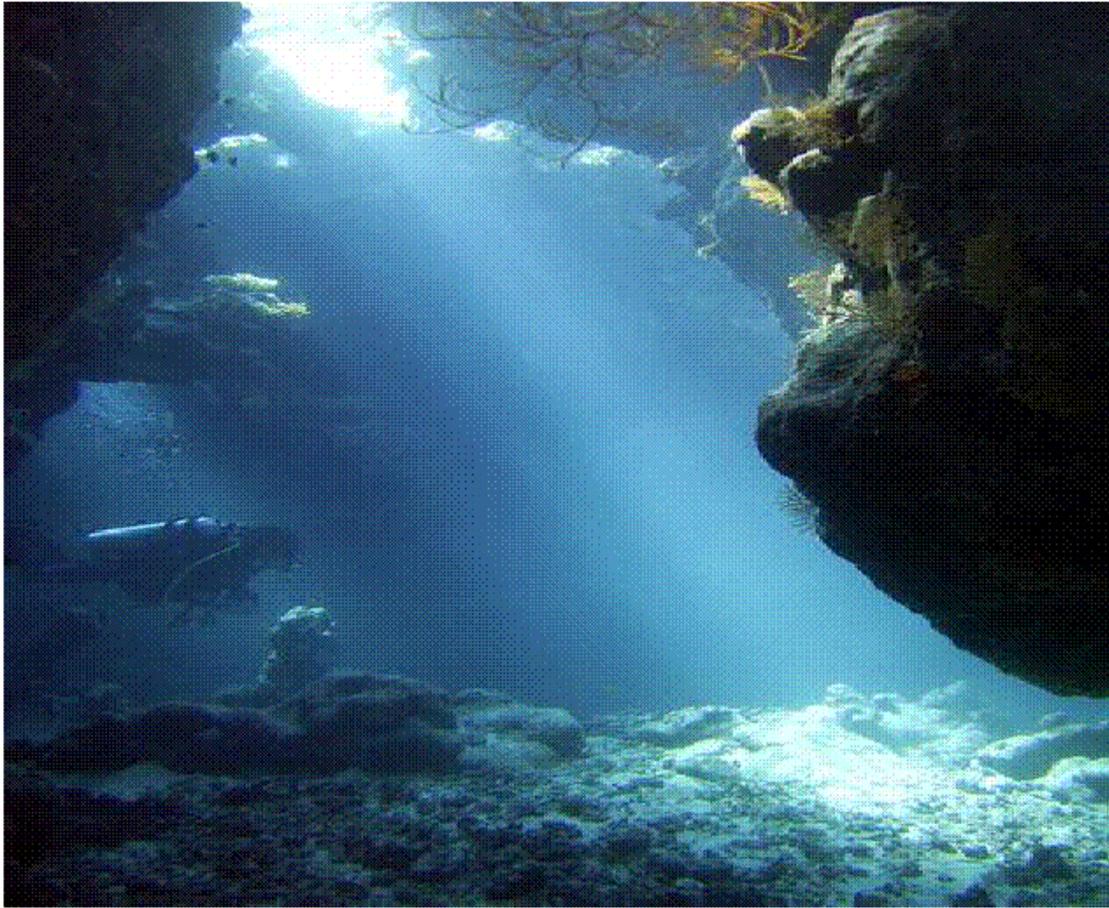


OBJETIVO

II. OBJETIVO

La toxicidad del oxígeno puro inhalado es conocida desde antiguo. Es frecuente la utilización de mezclas gaseosas enriquecidas en oxígeno para diferentes fines: en distintas enfermedades del aparato respiratorio, en la medicina hiperbárica y en los buceadores profesionales y de combate. Esta utilización del oxígeno con fines medicinales, deportivos o de otro tipo en ocasiones produce trastornos de mayor o menor importancia relacionados como es lógico con la enorme capacidad oxidante de este gas.

Para tratar de aclarar cómo se produce esta toxicidad o como podríamos disminuirla especialmente a nivel del sistema pulmonar, hemos diseñado este trabajo de investigación, por un lado *“in Vitro”* cultivando en hiperoxia neumocitos tipo II, por otro lado hemos realizado dos tipos de experimentos *“in Vivo”*. Uno de ellos para medir los cambios en el estrés oxidativo producido por la hiperoxia en buceadores y por último evaluar la influencia de la humedad ambiental sobre la toxicidad pulmonar de dicho gas en hiperoxia en animales de experimentación.



MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y METODOS

1. In Vitro (Neumocitos)

1.1. Células y Cultivo

Utilizamos cultivos de la línea celular RLE-6TN, proporcionada por la ATCC. Las células fueron cultivadas en medio Ham's F12 (Gibco-BRL) suplementado con extracto de suero bovino fetal 10% (Sigma), 2mM de glutamina (Gibco), 10 µg/ml de extracto de pituitaria bovina (Sigma), 2,5% ng/ml de factor de crecimiento de la insulina (Sigma) y 25 µg/ml de transferrina. Fueron incubadas a 37° C en frascos de cultivo de 75cm² (Nunc) en una atmósfera de 5% CO₂ y con una humedad de 90%. El cambio de medio se realizaba a los 3-4 días y se subcultivaron todas las semanas.

1.2. Curva de Crecimiento

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color amarillo (formazán), permitiendo determinar la función mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas será proporcional a la cantidad de formazán producido.

Se prepara una suspensión de RLE-6TN en medio de cultivo Ham's F12 18000 células/ml utilizando el método del azul tripán mediante un tratamiento con una disolución de tripsina 0,25% y EDTA 0,25%. Luego, sembramos 200 µl de dicha

suspensión en cada uno de los pocillos de una placa de 96 (Nunc) (1200, 2500 y 5000 células/pocillo), excepto en la primera columna que se deja como blanco y en la que sólo se pone 200 µl de medio de cultivo sin células. Esta columna, será nuestro control negativo, control de ausencia de contaminación y control de ausencia de coloración debido a los reactivos utilizados. Después de la siembra, dejamos incubar a 37°C con un 5% de CO₂ y 21% de O₂, hasta que exista en los pocillos un 80-90% de confluencia celular.

Una vez conseguida la confluencia deseada, se elimina el medio de cultivo y se reemplaza por 200 µl de medio fresco Ham's F12 sin rojo fenol y 50 µl de la disolución de MTT previamente preparada (el MTT queda en el medio a 1 mg/ml), dejando incubar durante 4 horas bajo las mismas condiciones de temperatura, O₂ y CO₂.

Preparación de la disolución de MTT:

- Se calienta medio de cultivo Ham's F12 sin rojo fenol a 37°C.
- Añadir la cantidad de MTT necesaria para obtener una disolución de 5 mg/ml.
- Filtrar a través de un filtro de 0,22 µm para eliminar los residuos insolubles y reducir la contaminación.
- Guardar a 4°C protegido de la luz.

Finalmente, retiramos el medio de cultivo de los pocillos para eliminar el MTT no metabolizado, y el MTT metabolizado a formazán por las células se libera tras disolver las membranas celulares con 100 µl de dimetil sulfóxido (DMSO, Prolabo). Agitamos suavemente la placa de 96 pocillos y medimos la absorbancia en el lector de placas (Multiskan MCC 340) a una longitud de onda de 570 nm, utilizando 690 nm como longitud de onda de referencia (para eliminar la absorbancia inespecífica

de la placa). El porcentaje de supervivencia resultó de dividir la absorbancia media de las células tratadas por la absorbancia media de las células control (no tratadas) a la que se resta la absorbancia media del control negativo, y multiplicando por 100. La estimación de la viabilidad celular se realizó cada 24 horas durante 4 días.

La correlación entre el número de células y la absorbancia durante los 4 días del crecimiento celular fue medido utilizando una correlación lineal que corresponde a la siguiente ecuación: λ (absorbancia) = -0.0402 + 0.0075 x número de pocillos por célula con una r de Pearson igual a 0,99 (p<0.0001).

1.3. Detección de micoplasmas

Para comprobar que las células estaban libres de una posible infección por micoplasmas (una situación que podría afectar al crecimiento), el DNA de la célula se tiñó con una disolución de colorante Hoestch 33258 (bis-benzimidazol) entre 0,05 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Los cultivos de células se observaron al microscopio de fluorescencia a 400 aumentos (Ex = 360; Em = 435) para comprobar que el cultivo estaba libre de infecciones por micoplasmas.

1.4. Tratamiento con Oxígeno

Las células se cultivaron en una atmósfera hiperóxica (95% O₂, 5% CO₂) para ello se utilizó un recipiente hermético con una entrada conectada a la botella de oxígeno puro, con una salida al exterior con el fin de que no aumentara la presión en su interior y con absorbente de CO₂ (hidróxido de calcio) para evitar la intoxicación por CO₂ y la acidificación del medio de cultivo. Con un analizador se midió la concentración de oxígeno en su interior. El recipiente contaba con las condiciones de

esterilidad necesarias para el crecimiento de las células.

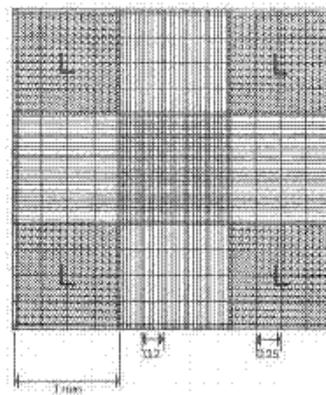
1.5. Estudio Viabilidad Celular

1.5.1. Método del Azul de Tripán

Para determinar la viabilidad celular se emplean diferentes métodos. El más común es el de tinción con azul tripán. El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Se mezcla una solución de azul tripán (0,4%) en una relación de volumen 1/1 con la suspensión celular. Así pues, las células teñidas claramente de color azul son consideradas no viables. Nos basta con una cámara de recuento celular, por ejemplo la cámara de Neubauer, y un microscopio. La cámara de Neubauer es un cuadrado de 3x3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0,25 mm. Por lo que el área sembrada (L) corresponde a 1 mm². La depresión central del portaobjetos está hundida 0,1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con el cubreobjetos, éste dista de la superficie marcada 0,1 mm, y el volumen comprendido entre la superficie “L” y el cubreobjetos es de 0,1 mm³, es decir 0,1 µl.

Si contamos las cuatro áreas sombreadas (L) observando un total de “X” células entre las cuatro áreas, la concentración en la suspensión celular será:

$$(\text{células/ml}) = 10000 \text{ (} \text{“X”}/4 \text{)}$$



1.5.2. Test de Viabilidad (ensayo del MTT)

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color amarillo (formazán), permitiendo determinar la función mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas será proporcional a la cantidad de formazán producido.

Se prepara una suspensión de RLE-6TN en medio de cultivo Ham's F12 18000 células/ml utilizando el método del azul tripán mediante un tratamiento con una disolución de tripsina 0,25% y EDTA 0,25%. Luego, sembramos 200 μ l de dicha suspensión en cada uno de los pocillos de una placa de 96 (1200, 2500 y 5000 células/pocillo), excepto en la primera columna que se deja como blanco y en la que sólo se ponen 200 μ l de medio de cultivo sin células. Esta columna, será nuestro control negativo, control de ausencia de contaminación y control de ausencia de coloración debido a los reactivos utilizados. Después de la siembra, dejamos incubar a 37°C con un 5% de CO₂, hasta que exista en los pocillos un 80-90% de confluencia celular. A continuación las placas con las células se cambian a una atmósfera con el 5% de CO₂ y 99,9% de O₂ a 37°C durante 24, 48, 72 y 96 horas.

Transcurrido este tiempo, se elimina el medio de cultivo y se reemplaza por 200 μ l de medio fresco Ham's F12 sin rojo fenol y 50 μ l de la disolución de MTT previamente preparada (el MTT queda en el medio a 1 mg/ml), dejando incubar durante 4 horas bajo las mismas condiciones de temperatura, O₂ y CO₂.

Preparación de la disolución de MTT:

- Se calienta medio de cultivo Ham's F12 sin rojo fenol a 37°C.
- Añadir la cantidad de MTT necesaria para obtener una disolución de 5 mg/ml.
- Filtrar a través de un filtro de 0,22 µm para eliminar los residuos insolubles y reducir la contaminación.
- Guardar a 4°C protegido de la luz.

Finalmente, retiramos el medio de cultivo de los pocillos para eliminar el MTT no metabolizado, y el MTT metabolizado a formazán por las células se libera tras disolver las membranas celulares con 100 µl de dimetil sulfóxido (DMSO, Prolabo). Agitamos suavemente la placa de 96 pocillos y medimos la absorbancia en el lector de placas (Multiskan MCC 340) a una longitud de onda de 570 nm, utilizando 690 nm como longitud de onda de referencia (para eliminar la absorbancia inespecífica de la placa). El porcentaje de supervivencia resultó de dividir la absorbancia media de las células tratadas por la absorbancia media de las células control (no tratadas) a la que se resta la absorbancia media del control negativo, y multiplicando por 100. La estimación de la viabilidad celular se realizó cada 24 horas durante 4 días.

La correlación entre el número de células y la absorbancia durante los 4 días del crecimiento celular fue medido utilizando una correlación lineal que corresponde a la siguiente ecuación: λ (absorbancia) = -0,0402 + 0,0075 x número de pocillos por célula con una r de Pearson igual a 0,99 (p<0.0001).

1.5.3. Ensayo de la Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Se recoge el sobrenadante del cultivo celular y se incuba con sal de tetrazolio. Reactivo que pertenece al kit Cytotoxicity Detection Kit (LDH) 1644 793 de ROCHE. La actividad de la LDH es determinada por un test enzimático: en el primer paso la LDH realiza la conversión de lactato a piruvato, en este proceso el NAD^+ es reducido a NADH/H^+ . En el segundo paso el catalizador transfiere H/H^+ desde el NADH/H^+ a la sal de tetrazolio amarilla (2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-cloruro de feniltetrazolio) reduciéndose a formazán de color púrpura.

Un aumento en la actividad de la LDH en el sobrenadante del cultivo se interpretará como un incremento en la muerte celular o en el número de células dañadas en sus membranas. El aumento en la actividad enzimática en el sobrenadante es directamente correlacionada con la cantidad de formazán formado durante un periodo de tiempo limitado. Por tanto, la intensidad de color en el ensayo será proporcional al número de células lisadas. El tinte del formazán es hidrosoluble y muestra un máximo de absorción a 500 nm (492 nm), mientras que la sal de tetrazolio no muestra una absorción significativa a esa longitud de onda.

1.6. Detección de Especies Reactivas de Oxígeno

El 2',7'-diclorofluoresceína reducido (DCF) es una sustancia química no fluorescente que en presencia de especies reactivas de oxígeno es oxidado por esterasas intracelulares convirtiéndose en una sustancia que emite fluorescencia por lo que dicha oxidación ocurre en el interior de la célula. Esta reacción química es detectada por un aumento en la fluorescencia con un fluorímetro que dispone de las fuentes de excitación y filtros (Excitación: 492-495/Emisión: 517-527 nm) apropiados para detectar dicha fluorescencia.

1.7. Detección de Muerte Celular In Situ (POD)

El test In Situ Cell Death Detection, POD No Cat. 11 684 817 910 de Roche está basado en la detección de las cadenas fragmentadas de DNA simples y dobles que tienen lugar durante los primeros estadios de la apoptosis. Las células apoptóticas son fijadas y permeabilizadas. Después, son incubadas con el enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT) y con nucleótidos marcados con fluoresceína (dUTP). Durante este periodo de incubación el TdT cataliza la adición del dUTP a los grupos 3'-OH libres de los fragmentos simples y dobles de DNA de las células apoptóticas. Después se lava para eliminar el dUTP no unido y se incuba ahora con un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con un el enzima peroxidasa. A continuación, se lava para eliminar el anticuerpo no unido. De este modo los fragmentos de DNA producidos durante la apoptosis se pueden visualizar en presencia del sustrato de la peroxidasa.

2. In Vivo

2.1. En animales de experimentación (Ratas)

2.1.1. Equipos Analíticos Necesarios

Cámara Hiperbárica de 282 litros de capacidad, 60 cm de diámetro y 1 metro de largo. La cámara está preparada para alcanzar presiones equivalentes a 100 metros de profundidad (10 ATA); Manoreductores; Higrómetro (Igrómetro 96 Umid.Rel.PmF); Termómetro; Manómetro L'air liquide De 38/50; Oxígeno Medicinal; Analizador de oxígeno. Beckman OM-11; Gel de Sílice Panreac, gránulos de 3-6 mm con indicador. Consigue resecar el oxígeno; Motor impulsor. KnF, Neuberger D-79112 Freiburg Type NO26ANE; Temporizador. Montcable;

Humidificador del oxígeno; Rotámetro. NI/h Luft 20° 760 Torr 136077; Tubo fluorescente de 12 v.

2.1.2. Diseño del Experimento

Se ha diseñado un estudio de metodología cuantitativa, analítico experimental, controlado, donde el factor de estudio es la variable que define el grado de humedad y la variable de respuesta el tiempo de supervivencia. Los experimentos se desarrollaron en la Unidad de Investigación Subacuática (UIS) del Centro de Buceo de la Armada Española. Los animales de experimentación fueron hembras Sprague-Dawley (SD) de 150-200 gr de peso y de 7-8 semanas de edad.

Los animales se trasladaban desde la Universidad de Murcia al CBA tres días antes del comienzo del experimento y se introducían en la cámara hiperbárica con la puerta abierta, respirando aire atmosférico y respetando los periodos de sueño-vigilia.

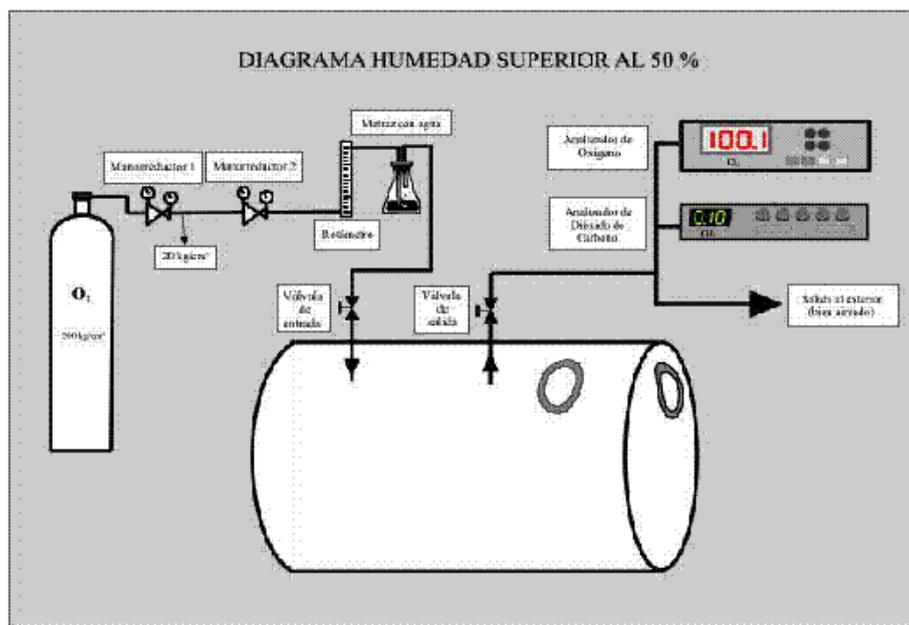
Se trabajó con un total de 60 animales que se dividieron en 3 grupos. El grupo 1 respiró oxígeno húmedo (humedad relativa > 50%) (n=27). El grupo 2 (humedad < 50%) (n=22). El tercer grupo fue el control (humedad ambiental) (n=11).

Los animales se introducen en la cámara en grupos de 5-6. Una vez que la cámara está cerrada herméticamente, se procede a obtener la concentración de oxígeno y el grado de humedad deseado que se controlan de forma periódica al igual que los parámetros basales: concentración de O₂, CO₂, humedad, temperatura, flujo, presión de la botella, así como la sintomatología clínica. Cuando los animales sobrevivían 168 h en la cámara eran sacrificados ya que se demostró que superado este periodo los roedores no morían. Los animales, durante toda su estancia en la cámara, eran abastecidos de suficiente agua y comida (dieta A04, Panlab SA) con un

contenido en proteína bruta del 15,4 %, celulosa bruta 4,1 %, materias grasas brutas 2,9 %, cenizas brutas 5,3 %, vitamina A 15000 UI/Kg, vitamina D3 1500 UI/Kg, vitamina E 20 mg/Kg y de sulfato cúprico 12 mg/Kg.

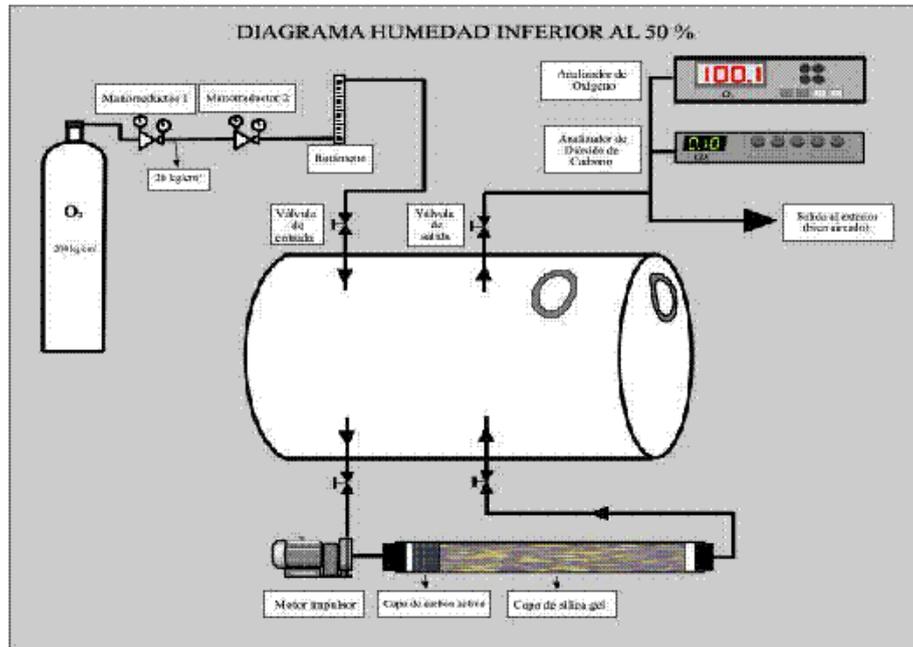
GRUPO 1 (Humedad > 50 %): Con una humedad media del 90% (Fig. 1).

Figura 1: Esquema seguido para los experimentos en el grupo de ratas que respiraron oxígeno húmedo.



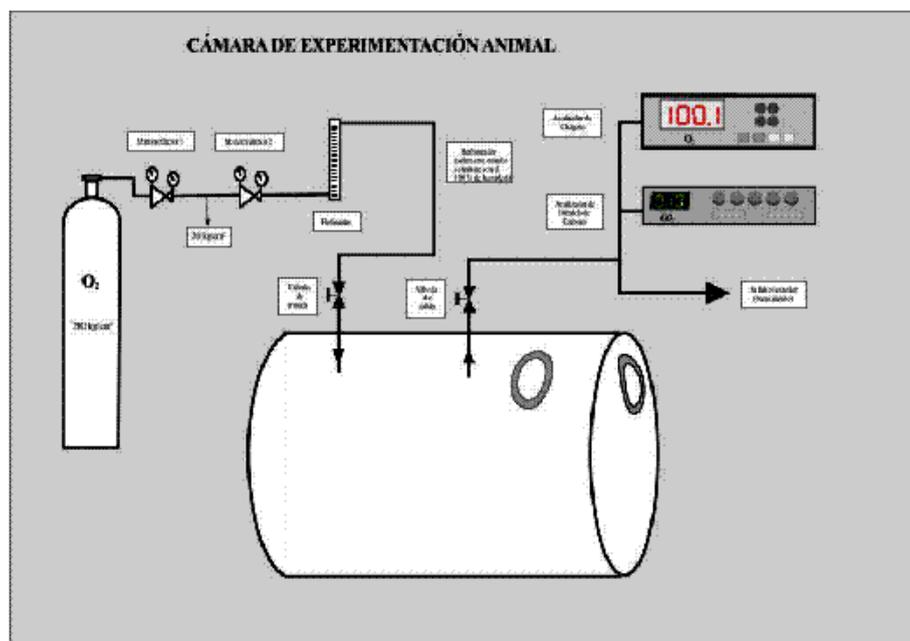
GRUPO 2 (Humedad < 50 %): Con una humedad media del 30% (Fig. 2).

Figura 2: Esquema seguido para los experimentos en el grupo de ratas que respiraron oxígeno seco.



GRUPO 3 (Humedad ambiental): Con una humedad media del 57% (Fig. 3).

Figura 3: Esquema seguido para los experimentos en el grupo control.



2.1.3. Estudio Morfológico

Se extrajeron los pulmones y se analizaron en el departamento de Anatomía Patológica en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

El tejido fue conservado en formol al 10%, se realizó el tallado de todos los lóbulos pulmonares. A continuación para que el tejido pudiera ser estudiado con el microscopio debe ser seccionado en cortes muy delgados. Previamente es necesario conferirles una consistencia homogénea mediante lo que llamamos el proceso de inclusión. Éste se realiza habitualmente mediante procesadores automáticos de tejidos y estaciones de inclusión, aunque también puede hacerse en forma manual. Se empleó el método de inclusión en parafina: Su objetivo es sustituir el agua del tejido por parafina líquida caliente (58° C) que al enfriarse adquirirá una consistencia adecuada para el corte. Como la parafina es insoluble en agua es preciso eliminar previamente esta última del tejido, sustituyéndola inicialmente por alcohol (deshidratación) y posteriormente por tolueno o xileno (aclaramiento) que al ser solubles en parafina pueden ser sustituidos finalmente por ella. Así se obtendrá un tejido embebido en parafina que será introducido en moldes con parafina líquida. Al enfriarse los moldes obtendremos un "bloque de parafina" a partir del cual pueden obtenerse las secciones.

A partir de los bloques se obtienen cortes muy finos, de 3 a 5 micras de espesor. El corte se realiza mediante unos aparatos llamados microtomos. Una vez obtenidos los cortes se extenderán en un baño de agua caliente y fijarán sobre un portaobjetos para después ser teñidos.

Los cortes obtenidos son tratados mediante un proceso de "desparafinado" para eliminar la parafina y volver a sustituirla por agua, siendo posteriormente teñidos. La técnica de tinción utilizada fue la hematoxilina-eosina.

Tras su tinción, los cortes histológicos fueron cubiertos con una lámina muy fina de cristal o material plástico llamada cubreobjetos previa aplicación de un medio líquido transparente de montaje que posteriormente se solidificará, quedando listos para ser estudiados con el microscopio óptico Zeiss.

2.2. En Humanos (Buceadores)

2.2.1. Sujetos

Se incluyeron quince buceadores profesionales del Centro de Buceo de la Armada Española en este estudio. Participaron en un programa de entrenamiento que consistió en la realización de una inmersión durante 1 hora a 7 metros de profundidad respirando oxígeno al 100% con un equipo de oxígeno de circuito cerrado (LAR VI 1. Draeger, Luebeck, Alemania). El entrenamiento se prolongó 2 o 3 veces a la semana durante las primeras seis semanas. Todos los sujetos estaban sanos, sin enfermedad renal, hepática o diabetes en su historial clínico personal. Todos los individuos dieron su consentimiento para la realización de este estudio.

Se recogieron tres muestras de orina y sangre por cada alumno, previo, después de 6 semanas y al final del programa de entrenamiento. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa, centrifugadas y almacenadas a -80°C hasta su análisis para obtener el hemograma de las muestras en el Hospital Naval de Cartagena. Las muestras fueron recogidas y congeladas a -80°C hasta el análisis.

2.2.2. Parámetros del Hemograma

2.2.2.1. Leucocitos

Inicialmente formados en la médula ósea, los leucocitos son producidos también en los órganos del sistema linfático, como son el bazo, el timo y los ganglios

linfáticos. Su misión es luchar contra las infecciones y proteger al cuerpo contra las enfermedades. El valor leucocitario está expresado por 1000/uL y sus valores normales son de 3,5 – 12 x1000/uL.

2.2.2.2. Hematíes

También denominados glóbulos rojos, son las células sanguíneas que contienen en su interior la hemoglobina. Son los principales portadores de oxígeno a las células y tejidos del cuerpo. Tienen una forma bicóncava para adaptarse a una mayor superficie de intercambio de oxígeno por dióxido de carbono en los tejidos. Además su membrana es flexible lo que permite a los glóbulos rojos atravesar los más estrechos capilares. Su valor se expresa en millones por unidades de litro.

2.2.2.3. Hemoglobina

Es una proteína que contiene hierro y que le otorga el color rojo a la sangre. Se encuentra en los hematíes y es la encargada del transporte del oxígeno por la sangre desde los pulmones a los tejidos. También transporta el dióxido de carbono, que es el producto de desecho del proceso de producción de energía, lo lleva a los pulmones donde es exhalado al aire. El análisis de hemoglobina se realiza normalmente en un estudio completo de hematimetría, con el recuento de hematíes. Viene expresada en gramos por dl y el rango óptimo es de 12 – 18 g/dl.

2.2.2.4. Hematocrito

El hematocrito es el porcentaje del volumen de la sangre que ocupa la fracción de los glóbulos rojos. Sus valores normales oscilan entre el 40-54%.

2.2.2.5. Volumen Corpuscular Medio (VCM)

Mide el volumen promedio de todos los glóbulos rojos así como su contenido hemoglobínico. Un volumen corpuscular medio bajo significa que las células son más pequeñas de lo normal. Esto normalmente es causado por deficiencia de hierro o enfermedades crónicas. Un volumen corpuscular medio alto puede ser causado por los medicamentos anti VIH. Esta no es una condición peligrosa. Sin embargo, un volumen corpuscular medio alto puede indicar anemia megaloblástica. El VCM tiene unos valores normales de 80 – 110 femtolitros (fL).

2.2.2.6. Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)

La HCM es el contenido medio de hemoglobina en los glóbulos rojos, expresa el promedio de peso de la hemoglobina en los glóbulos rojos. Sus valores normales oscilan entre 27 y 32 picogramos.

2.2.2.7. Concentración Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)

Relaciona el peso de la hemoglobina con el hematocrito. Este análisis define la concentración de hemoglobina en 100 ml de glóbulos rojos. Ayuda a distinguir las células coloreadas normales de las que están más pálidas lo que es útil para clasificar las diferentes anemias y determinar sus causas. Se expresa en gramos por dl y sus valores normales son 30 – 36 g/dl.

2.2.2.8. Índice Dispersión Eritrocitaria (RDW)

El RDW es un parámetro que mide el rango de dispersión de los tamaños de los glóbulos rojos. Puede ser usado para detectar sutiles grados de anisocitosis a partir de histogramas del tamaño de glóbulos rojos. Un rango de 11,5 – 15,5% de RDW se considera normal.

2.2.2.9. Plaquetas

Algunas de las células madre que producen los glóbulos rojos en la médula ósea se especializan convirtiéndose en unas células grandes llamadas Megacariocitos, los cuales engloban hasta 4000 plaquetas cada uno (discos con una sustancia adherente en la superficie), estas células se rompen y vierten al caudal sanguíneo las plaquetas, teniendo una vida de 10 días aproximadamente. Rango plaquetario normal es de 150 – 500 x1000/uL.

2.2.2.10. Volumen Plaquetario Medio (VPM)

Es variable; pero si el nivel de plaquetas es bajo el volumen plaquetario será bajo. La relación entre el volumen de plaquetas y el recuento de plaquetas ayuda a determinar el volumen y tamaño de las plaquetas. El rango normal oscila entre 7,4 – 13 fL.

2.2.2.11. Plaquetocrito

Es el porcentaje del volumen de plaquetas sobre el volumen total de sangre. Los valores normales están comprendidos entre 0 – 50%.

2.2.2.12. Linfocitos %

Los linfocitos son los responsables del reconocimiento específico y la respuesta a los virus, células cancerosas, y otras sustancias extrañas dentro del cuerpo. Los anticuerpos producidos por los linfocitos B de una persona sana recubren los antígenos extraños, marcándoles para que sean atacados por los neutrófilos. Tanto los linfocitos B como los T, viven bastante tiempo recorriendo todo el cuerpo (en

tomo a 4 años). El porcentaje normal para los linfocitos sanguíneos oscila entre el 22 y el 45%.

2.2.2.13. Neutrófilos %

Los neutrófilos son los glóbulos blancos más numerosos. Son unas células móviles que capturan las partículas extrañas y bacterias que han entrado en el cuerpo, englobándolas y digiriéndolas. A menudo a estas células se les llama fagocitos. El análisis se lleva a cabo para relacionar el recuento de neutrófilos con otros recuentos de células de la sangre. Su rango normal es de 45 – 75%.

2.2.2.14. Monocitos %

Los monocitos son un tipo de leucocitos producidos en la médula ósea, proviniendo de las mismas células madre que los neutrófilos. Se mueven continuamente por el torrente sanguíneo y por los tejidos del cuerpo donde maduran convirtiéndose en macrófagos. Los monocitos capturan y destruyen bacterias y otras sustancias extrañas, eliminan las células muertas del cuerpo, participan en el metabolismo del hierro y procesan información referente a antígenos extraños para los linfocitos. Los resultados analíticos normales para este parámetro son de 0 – 15%.

2.2.2.15. Eosinófilos %

Los eosinófilos son un tipo de leucocitos que engloban y digieren sustancias marcadas por anticuerpos y desempeñan funciones en las reacciones inflamatorias. El análisis se realiza para identificar recuentos anormales y monitorizar el progreso de la enfermedad. Los valores normales para el porcentaje de eosinófilos son de 0,5% a 11%.

2.2.2.16. Basófilos %

Los basófilos son un tipo de leucocitos que secretan sustancias químicas capaces de provocar una reacción inflamatoria en el cuerpo. El porcentaje normal de basófilos sanguíneos es de 0 al 2%.

2.2.2.17. Linfocitos Valor Absoluto (LVA)

Es el recuento de linfocitos sanguíneos que presenta un individuo por mililitro. Su rango óptimo es de 1,5 – 4,5 por ml.

2.2.2.18. Neutrófilos Valor Absoluto (NVA)

Es el recuento de neutrófilos sanguíneos que presenta un individuo por 1000 y por unidad de litro. Su rango óptimo es de 1,5 – 7,5 x1000/uL.

2.2.2.19. Monocitos Valor Absoluto (MVA)

Es el recuento de monocitos sanguíneos que presenta un individuo por 1000 y por unidad de litro. Su rango óptimo es de 0 – 1,5 x1000/uL.

2.2.2.20. Eosinófilos Valor Absoluto (EVA)

Es el recuento de eosinófilos sanguíneos que presenta un individuo por mililitro. Su rango óptimo es de 0 - 0,6/ml

2.2.2.21. Basófilos Valor Absoluto (BVA)

Es el recuento de basófilos sanguíneos que presenta un individuo por mililitro. Su rango óptimo es de 0 - 0,2/ml.

2.2.3. Cuantificación Óxido Nítrico

El NO del suero fue medido utilizando un ensayo colorimétrico no enzimático que convierte el nitrato en nitrito usando cadmio metálico (Oxford Biomedical Research, Inc. Oxford, MI, USA). En aquellas muestras donde las concentraciones de proteínas son altas, el cadmio ha sido descrito como un catalizador más importante que la nitrato reductasa en presencia de fuertes reacciones desproteinizantes. La reducción de nitrato a nitrito es cuantificada por espectrofotometría utilizando la reacción de Griess.

2.2.4. Estado Antioxidante Total

Evaluamos el estado antioxidante total (TAS) con el ensayo comercializado TEAC (Randox Laboratories Ltd, United Kingdom), basado en la medición de la intensidad de color (colorimetría) del catión radical ABTS de color azul-verdoso detectable a 600 nm. La producción del color es inversamente proporcional a la concentración de antioxidantes en la muestra ya que disminuye con la presencia de. El ensayo fue llevado a cabo en un analizador Hitachi 912 (Roche Diagnostics Systems).

2.2.5. Glutation Peroxidasa

Los niveles plasmáticos de glutatión peroxidasa (GPx) fueron analizados por un inmunoensayo comercial enzima ligado (ELISA) amplificado en su último paso con el sistema biotina-estreptavidina (Bioxytech, OxisResearch, Portland, USA). Las muestras son incubadas en presencia de anticuerpos conjugados con un sustrato específico para la glutatión peroxidasa humana. La cantidad de este enzima presente en las muestras es estimada por la medición de la absorbancia a 405 nm siendo ambos parámetros proporcionales.

2.2.6. Isoprostanos Urinarios

Para la determinación de los niveles urinarios de 15-isoprostano F_{2t} se utilizó un inmunoensayo comercial enzima ligado competitivo (ELISA), el cual elimina las interferencias debidas a las uniones no específicas (EA 85, Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA). El 15-isoprostano F_{2t} de la muestra compete con otra molécula similar por unirse a un anticuerpo específico asociado a un enzima. Así en presencia del sustrato de dicho enzima asociado a la molécula competidora, la muestra se colorea siendo inversamente proporcional la intensidad de color con la cantidad de 15-isoprostano F_{2t} presente en la muestra. Los resultados fueron referidos a la concentración de creatinina urinaria en la muestra.

2.2.7. Método Estadístico

Los contrastes estadísticos utilizados para el test de viabilidad, el ensayo de lactato deshidrogenasa y la detección de especies reactivas de oxígeno fueron análisis de medidas repetidas donde el diseño factorial fue jerarquizado, los factores principales ortogonales: tiempo y concentraciones y el factor anidado los cultivos celulares.

Para el contraste de hipótesis de la influencia de la humedad en la supervivencia de animales de experimentación en atmósferas hiperóxicas se desarrolló un test de varianza, ANOVA para un factor, utilizando la prueba de Scheffé para el análisis de comparaciones múltiples. En la comparación de frecuencias, se ha aplicado el test de la Chi cuadrado, utilizando la corrección por continuidad de Yates cuando no cumplían los requisitos necesarios. Considerando este estudio por su diseño, analítico longitudinal, se utilizó como medida de riesgo la Incidencia Absoluta y el Riesgo Relativo, para cuantificar las diferencias del riesgo

de morir entre los grupos y el control, con un intervalo de confianza para el 95%. El análisis estadístico se ha realizado con el programa SPSS 11,5 para Windows. Se consideró significación estadística un valor de $p < 0,05$.

Por último, para el estudio estadístico de todos los parámetros observados en buceadores durante la exposición a hiperoxia se utilizó un análisis de varianza de medidas repetidas.

Todos los contrastes o test se han realizado con un nivel de significación del 5%.



RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1 In Vitro

1.1. Parte Descriptiva De Los Resultados

1.1.1. Curva de Crecimiento en condiciones normales

El método utilizado para el estudio del crecimiento de los cultivos celulares fue el ensayo del MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio). Este ensayo está basado en la reducción metabólica de dicho compuesto (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color amarillo (formazán), permitiendo determinar la función mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas será proporcional a la cantidad de formazán producido. El MTT metabolizado a formazán por las células se libera tras disolver las membranas celulares con dimetil sulfóxido. Se sembró 200 μ l de suspensión celular en cada uno de los pocillos de una placa de 96 con el fin de obtener 1200, 2500 y 5000 células/pocillo. Por último se midió la absorbancia en el lector de placas a una longitud de onda de 5701 nm a las 24, 48, 72 y 96 h de crecimiento en condiciones normales (21% O₂, 5% CO₂, 37°C).

El crecimiento que experimentaron los cultivos celulares en condiciones normales fue exponencial hasta llegar a estabilizarse tras 96 horas de crecimiento (Fig. 4).

Los resultados de la curva de crecimiento de los cultivos celulares en condiciones normales están expresados en n°células (X1000)/horas (Tabla 2).

Tabla 2. Valores absolutos del crecimiento de neumocitos tipo II en condiciones normales con respecto al tiempo utilizando el ensayo del MTT.

Nº Células	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1250	1,25	7,83	15,38	41,98	58,83
2500	2,5	12,07	38,36	59,12	64,05
5000	5	17,92	46,23	76,84	91,82
Promedio	2,92	12,61	33,32	59,31	71,57
Desvstand	1,91	5,07	16,03	17,43	17,73

Los datos descriptivos del ensayo del MTT en condiciones normales se exponen en la tabla 3.

Tabla 3. Estadísticos descriptivos del ensayo de viabilidad (MTT).

Número de Células	Media	Desv. Típ.	N
0 h			
1250	1,3500	0,00000	2
2500	2,6400	0,04243	2
5000	5,0850	0,00707	2
Total	3,0250	1,69686	6
24 h			
1250	7,9550	0,82731	2
2500	13,2800	1,64049	2
5000	27,1400	13,20875	2
Total	16,1250	10,67889	6
48 h			
1250	16,5450	1,81726	2
2500	31,7000	9,44695	2
5000	39,4850	9,62372	2
Total	29,2433	12,07901	6
72 h			
1250	26,5900	21,79303	2
2500	39,5400	27,57716	2
5000	50,8550	36,69177	2
Total	38,9950	25,18493	6
96 h			
1250	31,8350	38,06356	2
2500	37,8050	36,98876	2
5000	54,3800	52,99058	2
Total	41,3400	35,13053	6

1.1.2. Detección de Micoplasmas

Para comprobar que las células estaban libres de una posible infección por micoplasmas, el DNA de la célula fue teñido con una disolución de colorante Hoestch 33258 (bis-benzimidazol). Los cultivos de células fueron observados al microscopio de fluorescencia a 400 aumentos para confirmar que el cultivo estaba libre de infecciones por micoplasmas.

1.1.3. Ensayo del MTT en condiciones hiperóxicas

El ensayo empleado para el estudio del crecimiento de los cultivos celulares fue el mismo que en condiciones normales (MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio). Este ensayo está basado en la reducción metabólica de dicho compuesto realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color amarillo (formazán), permitiendo determinar la función mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas será proporcional a la cantidad de formazán producido. El MTT metabolizado a formazán por las células se libera tras disolver las membranas celulares con dimetil sulfóxido. Sembramos 200 µl de suspensión celular en cada uno de los pocillos de una placa de 96 con el fin de obtener 1200, 2500 y 5000 células/pocillo. Por último medimos la absorbancia en el lector de placas a una longitud de onda de 5701 nm a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición a oxígeno al 100%.

Se observó un aumento en el crecimiento de los neumocitos tipo II hasta las 48 h de exposición a oxígeno 100% a partir de las cuales y hasta las 96 h experimentan un descenso progresivo de su viabilidad en comparación con la situación control (Fig. 5).

Una vez obtenidos los resultados del crecimiento celular con el ensayo del MTT tanto en condiciones hiperóxicas como normales se compararon los valores. Los pocillos correspondientes a 1250, 2500 y 5000 células que no recibieron el tratamiento con oxígeno, es decir, los de 0 h muestran un crecimiento similar ya que las condiciones de crecimiento son similares. El crecimiento de las células en condiciones hiperóxicas fue menor significativamente que el de las células en condiciones normales salvo en el pocillo de 5000 células que presenta un crecimiento significativo comparándolas con su homólogo en condiciones normales. A las 48 h las células que crecieron en oxígeno puro disminuyeron su crecimiento significativamente frente a las que crecieron en condiciones normales a excepción del pocillo de 1250 células en hiperoxia que experimenta un aumento sin importancia estadística. A partir de las 72 h y hasta las 96 h en hiperoxia, las células ven disminuido significativamente su crecimiento con respecto a las que crecieron en condiciones normales tanto en los pocillos de 1250, 2500, como en los de 5000 células (Fig. 6).

Los datos descriptivos entre los que se engloban la media y la desviación típica del ensayo de viabilidad por el método del MTT se exponen en la tabla 4.

Tabla 4. Datos descriptivos del ensayo de viabilidad (MTT) en condiciones normales e hiperóxicas.

Horas	N° Células	Grupo	Media	Desv. Tip.	N
24 h	1250	Hiperoxia	0,04241	0,018136	22
		Control	0,03760	0,008044	10
		Total	0,04091	0,015708	32
	2500	Hiperoxia	0,06604	0,027633	23
		Control	0,05642	0,010344	12
		Total	0,06274	0,023456	35
	5000	Hiperoxia	0,17069	0,080625	23
		Control	0,08408	0,020620	12
		Total	0,14100	0,077997	35
	Total	Hiperoxia	0,09379	0,075165	68
		Control	0,06065	0,023711	34
		Total	0,08274	0,064639	102
96 h	1250	Hiperoxia	0,08223	0,016018	22
		Control	0,07320	0,010422	10
		Total	0,07941	0,014947	32
	2500	Hiperoxia	0,11661	0,015547	23
		Control	0,18000	0,020850	12
		Total	0,13834	0,035058	35
	5000	Hiperoxia	0,15222	0,021792	23
		Control	0,21600	0,035048	12
		Total	0,17408	0,040599	35
	Total	Hiperoxia	0,11753	0,033738	68
		Control	0,16129	0,064430	34
		Total	0,13212	0,050411	102
72 h	1250	Hiperoxia	0,05255	0,012779	22
		Control	0,18310	0,034806	10
		Total	0,09334	0,065133	32
	2500	Hiperoxia	0,09443	0,090789	23
		Control	0,27625	0,048267	12
		Total	0,15677	0,117278	35
	5000	Hiperoxia	0,11670	0,013943	23
		Control	0,35900	0,068952	12
		Total	0,19977	0,123617	35
	Total	Hiperoxia	0,08841	0,059423	68
		Control	0,27806	0,088361	34
		Total	0,15163	0,113864	102
96 h	1250	Hiperoxia	0,02177	0,015538	22
		Control	0,27490	0,046610	10
		Total	0,10087	0,122491	32
	2500	Hiperoxia	0,05439	0,011057	23
		Control	0,29925	0,028052	12
		Total	0,13834	0,119329	35
	5000	Hiperoxia	0,07891	0,017817	23
		Control	0,42900	0,030039	12
		Total	0,19894	0,170068	35
	Total	Hiperoxia	0,05213	0,027761	68
		Control	0,33788	0,076938	34
		Total	0,14738	0,144118	102

1.1.4. Ensayo de la Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Para el estudio del porcentaje de muerte celular se midió la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH). Este test consta de dos pasos: en el primer paso la LDH realiza la conversión de lactato a piruvato, en este proceso el NAD^+ es reducido a NADH/H^+ . En el segundo paso el catalizador transfiere H/H^+ desde el NADH/H^+ a la sal de tetrazolio amarilla (2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-cloruro de feniltetrazolio) reduciéndose a formazán de color púrpura.

Un aumento en la actividad de la LDH en el sobrenadante del cultivo se interpretará como un incremento en la muerte celular o en el número de células dañadas en sus membranas. El aumento en la actividad enzimática en el sobrenadante está directamente correlacionada con la cantidad de formazán formado durante un periodo de tiempo limitado. Por tanto, la intensidad de color en el ensayo será proporcional al número de células lisadas.

Observamos un aumento en el porcentaje de muerte celular con el paso de las horas tanto en las células que crecieron en condiciones normales como en presencia de oxígeno puro siendo mucho mayor y significativo estadísticamente en los cultivos en oxígeno al 100%. A las 0 h los valores del porcentaje de muerte celular es similar ya que las células crecen en las mismas condiciones, es decir, sin recibir el tratamiento con oxígeno. A partir de las 24 h y hasta las 96 h el porcentaje de muerte celular es significativamente mayor en las células hiperóxicas que en las controles alcanzando a las 72 y 96 h casi el 100% de muerte celular (Tabla 5, Fig 7).

Tabla 5. Estadísticos descriptivos del porcentaje de muerte celular por la técnica del enzima lactato deshidrogenasa.

Grupos	Media	Desv. Típ.	N
0 h			
Control	2,7680	0,79723	5
Hiperoxia	2,9720	0,99439	5
Total	2,8700	0,85645	10
24 h			
Control	6,7780	0,74868	5
Hiperoxia	29,7880	1,91783	5
Total	18,2830	12,20476	10
48 h			
Control	20,9600	0,59468	5
Hiperoxia	34,7420	3,18827	5
Total	27,8510	7,57873	10
72 h			
Control	23,8360	8,78737	5
Hiperoxia	87,5520	2,26072	5
Total	55,6940	34,12174	10
96 h			
Control	28,3600	6,06054	5
Hiperoxia	84,6140	13,72335	5
Total	56,4870	31,28990	10

1.1.5. Detección de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Los niveles de ROS fueron medidos de forma indirecta tanto en condiciones normales como en condiciones hiperoxicas por el compuesto 2',7'-diclorofluoresceina reducido (DCF). Se trata de una sustancia química no fluorescente que en presencia de especies reactivas de oxígeno es oxidado por esterasas intracelulares convirtiéndose en una sustancia que emite fluorescencia por lo que dicha oxidación ocurre en el interior de la célula. Esta reacción química es detectada por un aumento en la fluorescencia con un fluorímetro.

Aparece un aumento progresivo de los niveles de ROS en condiciones normales a partir de las 24 h hasta las 96 h.

En los cultivos que recibieron el tratamiento con oxígeno puro se produce un aumento significativo en los niveles de ROS a partir de las 24 h hasta las 96 h

($P < 0,0005$). A partir de las 96 h es cuando parece estabilizarse la producción de ROS. (Fig. 8)

En la Tabla 6 se representan los estadísticos de la prueba de detección de ROS.

Tabla 6. Estadísticos descriptivos entre los que se incluyen la media y la desviación típica de la prueba de detección de especies reactivas de oxígeno.

ROS	Media	Desv. Típ.	N
0 h			
Control	5,383	2,2176	6
Hiperoxia	7,133	3,0898	6
Total	6,258	2,7221	12
24 h			
Control	17,767	3,2562	6
Hiperoxia	21,015	5,9623	6
Total	19,391	4,8843	12
48 h			
Control	16,633	3,2983	6
Hiperoxia	15,117	3,1859	6
Total	15,875	3,1915	12
72 h			
Control	31,787	3,5633	6
Hiperoxia	46,017	9,7643	6
Total	38,902	10,2144	12
96 h			
Control	47,117	3,5852	6
Hiperoxia	72,350	6,6542	6
Total	59,733	14,1287	12

Los niveles de ROS obtenidos en condiciones hiperóxicas se compararon con los obtenidos en condiciones normales. Así, los niveles de ROS a las 0 horas son similares ya que las condiciones de crecimiento son iguales, es decir, las células no han recibido aún el tratamiento con oxígeno al 100%.

A partir de las 0 h y hasta las 96 h se produce un aumento significativo de los niveles de ROS de los cultivos hiperóxicos con respecto a los controles o normales ($P < 0,0005$) (Fig 8).

1.1.6. Detección de Muerte Celular In Situ (POD)

El estudio de la apoptosis se fundamenta en la detección de las cadenas fragmentadas de DNA simples y dobles que tienen lugar durante los primeros estadios de la apoptosis. Los datos descriptivos del ensayo se expresan en la tabla 7. Según aumenta el tiempo de exposición a oxígeno puro las células hiperóxicas presentan un nivel de apoptosis mayor, disminuyendo su densidad en la placa y mostrando una intensidad de color marrón mayor, producto del aumento en la detección de fragmentos de DNA simples y dobles por parte de la peroxidasa, mientras que las células que crecieron en oxígeno al 21% no muestran un nivel de apoptosis significativo ($P < 0,0005$). El nivel de apoptosis a las 24 y 48 horas en los cultivos tratados con oxígeno al 100% es detectable pero no es lo suficientemente significativo como para que la densidad celular se vea alterada. A partir de las 48 y hasta las 96 horas el nivel de apoptosis aumenta significativamente ($P < 0,0005$) provocando una importante disminución en la densidad celular del cultivo (Fig. 9 y 10).

Tabla 7. Estadísticos descriptivos de la prueba de detección de muerte celular in situ (POD).

	Tiempo	Media	Desv. Típ.	N
	Control	24 h		
1250		0,4229	0,018575	21
2500		0,6682	0,028027	22
5000		0,17070	0,080625	23
Total		0,09521	0,075856	66
48 h				
1250		0,08314	0,015812	21
2500		0,11682	0,015879	22
5000		0,15222	0,021792	23
Total		0,11844	0,033560	66
72 h				
1250		0,05200	0,012830	21
2500		0,09539	0,092814	22
5000		0,11670	0,013943	23
Total		0,08900	0,060224	66
96 h				
1250	0,02271	0,015265	21	
2500	0,05427	0,011302	22	
5000	0,07891	0,017817	23	
Total	0,05282	0,027475	66	
Hiperoxia	Tiempo	Media	Desv. Típ.	N
	24 h			
	1250	0,03760	0,008044	10
	2500	0,05642	0,010344	12
	5000	0,08408	0,020620	12
	Total	0,06065	0,023712	34
	48 h			
	1250	0,07320	0,010422	10
	2500	0,18000	0,020850	12
	5000	0,21600	0,035048	12
	Total	0,16129	0,064430	34
	72 h			
	1250	0,18310	0,034806	10
	2500	0,27625	0,048267	12
	5000	0,35900	0,068952	12
	Total	0,27806	0,088361	34
96 h				
1250	0,27490	0,046611	10	
2500	0,29925	0,028052	12	
5000	0,42900	0,030039	12	
Total	0,33788	0,076938	34	

	Tiempo	Media	Desv. Típ.	N
Totales	24 h			
	1250	0,04077	0,015949	31
	2500	0,06315	0,023685	34
	5000	0,14100	0,077997	35
	Total	0,08346	0,065086	100
	48 h			
	1250	0,07994	0,014886	31
	2500	0,13912	0,035280	34
	5000	0,17409	0,040599	35
	Total	0,13301	0,050393	100
	72 h			
	1250	0,09429	0,065986	31
	2500	0,15921	0,118141	34
	5000	0,19977	0,123617	35
	Total	0,15328	0,114393	100
	96 h			
	1250	0,10406	0,123158	31
2500	0,14074	0,120268	34	
5000	0,19894	0,170068	35	
Total	0,14974	0,144527	100	

Tabla 7. (Continuación). Estadísticos descriptivos de la prueba de detección de muerte celular in situ (POD).

1.2. Análisis Estadístico De Los Resultados

1.2.1. Ensayo del MTT en condiciones hiperóxicas

Las diferencias entre horas varían de forma cuadrática según la concentración de células ($P < 0,0005$) y de forma lineal si se trata del grupo hiperóxico o el control ($P < 0,0005$) (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis Estadístico del estudio de viabilidad por el método del MTT. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Horas	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Horas	Lineal	0,701	1	0,701	569,811	0,0005
	Cuadrático	0,052	1	0,052	42,737	0,0005
	Cúbico	0,001	1	0,001	0,533	0,467
Horas * Concentr.	Lineal	0,004	2	0,002	1,527	0,222
	Cuadrático	0,030	2	0,015	12,309	0,0005
	Cúbico	0,001	2	0,001	0,364	0,696
Horas * Grupos	Lineal	1,351	1	1,351	1098,886	0,0005
	Cuadrático	0,003	1	0,003	2,861	0,094
	Cúbico	0,016	1	0,016	9,744	0,002
Horas * Grupos * Concentr.	Lineal	0,090	2	0,045	36,708	0,0005
	Cuadrático	0,029	2	0,015	12,068	0,0005
	Cúbico	0,001	2	0,0005	0,267	0,767
Error (horas)	Lineal	0,118	96	0,001		
	Cuadrático	0,116	96	0,001		
	Cúbico	0,160	96	0,002		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

Hay diferencias entre las distintas concentraciones celulares ($P < 0,0005$) (Tabla 9), entre las distintas horas de exposición a oxígeno puro ($P < 0,0005$) (Tabla 10) y entre los grupos hiperóxico y control ($P < 0,0005$).

Existen diferencias entre las horas de exposición tanto de orden lineal como cuadrático ($P < 0,0005$). (Tabla 11)

Las diferencias entre las distintas concentraciones de células varían según el tratamiento recibido ($P < 0,0005$). (Tabla 11)

Tabla 9. Comparaciones por pares de las concentraciones celulares.

Concentraciones	N° Células	P
1250	2500	0,0005
	5000	0,0005
2500	1250	0,0005
	5000	0,0005
5000	1250	0,0005
	2500	0,0005

Tabla 10. Comparaciones por pares de las horas de exposición a oxígeno puro.

Horas	Horas Exposición	P
24 h	48 h	0,0005
	72 h	0,0005
	96 h	0,0005
48 h	24 h	0,0005
	72 h	0,0005
	96 h	0,0005
72 h	24 h	0,0005
	48 h	0,0005
	96 h	0,032
96 h	24 h	0,0005
	48 h	0,0005
	72 h	0,032

Las diferencias entre grupos varían según las concentraciones celulares ($P < 0,0005$). (Tabla 11)

Tabla 11. Análisis Estadístico del estudio de viabilidad por el método del MTT. Pruebas de los efectos inter-sujetos.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Intersección	7,752	1	7,752	4956,191	0,0005
Concentr.	0,653	2	0,326	208,707	0,0005
Grupos	1,263	1	1,263	807,419	0,0005
Grupos * Concentr.	0,037	2	0,018	11,714	0,0005
Error	0,150	96	0,002		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

1.2.2. Ensayo de la Lactato Deshidrogenasa (LDH)

A continuación se expresan las tablas 12 y 13 del contraste estadístico utilizado para el ensayo que detecta el enzima lactato deshidrogenasa. En ellas se pueden comprobar que las diferencias encontradas entre el grupo tratado con oxígeno y el control varían según las horas de exposición ($P < 0,0005$) y las diferencias entre horas varían según se trate del tipo de grupo ($P < 0,0005$).

Tabla 12. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Horas	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Horas	Lineal	20922,176	1	20922,176	362,822	0,0005
	Cuadrático	85,879	1	85,879	2,649	0,142
	Cúbico	449,652	1	449,652	21,030	0,002
	Orden 4	688,944	1	688,944	44,268	0,0005
Horas * Grupos	Lineal	5837,418	1	5837,418	101,230	0,0005
	Cuadrático	0,337	1	0,337	0,010	0,921
	Cúbico	160,808	1	160,808	7,521	0,025
	Orden 4	1541,490	1	1541,490	99,048	0,0005
Error (horas)	Lineal	461,321	8	57,665		
	Cuadrático	259,384	8	32,423		
	Cúbico	171,050	8	21,381		
	Orden 4	124,505	8	15,563		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

Tabla 13. Pruebas de los efectos inter-sujetos.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Intersección	51961,208	1	51961,208	1490,871	0,0005
Grupos	12319,163	1	12319,163	353,461	0,0005
Error	278,823	8	34,853		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

1.2.3. Detección de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Según el análisis estadístico se puede confirmar que las diferencias entre el grupo tratado con oxígeno y el control varían según las horas ($P < 0,0005$) y por tanto las diferencias entre horas varían según los grupos ($P < 0,0005$). (Tablas 14 y 15)

Tabla 14. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Horas	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Horas	Lineal	19190,811	1	19190,811	749,136	0,0005
	Cuadrático	1507,743	1	1507,743	140,598	0,0005
	Cúbico	250,679	1	250,679	13,997	0,004
	Orden 4	886,917	1	886,917	26,735	0,0005
Horas *	Lineal	1007,403	1	1007,403	39,325	0,0005
	Cuadrático	334,706	1	334,706	31,212	0,0005
	Cúbico	0,693	1	0,693	0,039	0,848
	Orden 4	116,019	1	116,019	3,497	0,091
Error (horas)	Lineal	256,173	10	25,617		
	Cuadrático	107,238	10	10,724		
	Cúbico	179,096	10	17,910		
	Orden 4	331,749	10	33,175		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

Tabla 15. Pruebas de los efectos inter-sujetos.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Intersección	47147,021	1	47147,021	1310,276	0,0005
Grupos	1106,564	1	1106,564	30,753	0,0005
Error	359,825	10	35,983		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

1.2.4. Detección de Muerte Celular In Situ (POD)

Podemos decir que las diferencias apreciadas entre los distintos tiempos de exposición, así como las diferentes concentraciones de células y los grupos control e hiperóxico varían según la concentración celular ($P < 0,0005$), el tiempo de exposición ($P < 0,0005$) y de si las células fueron o no tratadas ($P < 0,0005$). (Tablas 16 y 17)

Tabla 16. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Horas	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Horas	Lineal	0,693	1	0,693	552,885	0,0005
	Cuadrático	0,051	1	0,051	41,445	0,0005
	Cúbico	0,001	1	0,001	0,491	0,485
Horas *	Lineal	1,337	1	1,337	1066,596	0,0005
	Cuadrático	0,003	1	0,003	2,776	0,099
	Cúbico	0,016	1	0,016	9,624	0,003
Horas *	Lineal	0,004	2	0,002	1,476	0,234
	Cuadrático	0,030	2	0,015	12,003	0,0005
	Cúbico	0,001	2	0,001	0,339	0,714
Horas *	Lineal	0,090	2	0,045	35,758	0,0005
	Cuadrático	0,029	2	0,014	11,606	0,0005
	Cúbico	0,001	2	0,001	0,322	0,726
Error (horas)	Lineal	0,118	94	0,001		
	Cuadrático	0,116	94	0,001		
	Cúbico	0,159	94	0,002		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

Tabla 17. Pruebas de los efectos inter-sujetos.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Intersección	7,685	1	7,685	4829,567	0,0005
Grupos	1,245	1	1,245	782,166	0,0005
Concentr.	0,646	2	0,323	203,048	0,0005
Grupos * Concentr.	0,037	2	0,018	11,555	0,0005
Error	0,150	94	0,002		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

Se aplicó una prueba de homogeneidad de varianzas para la que el nivel de significación fue $< 0,05$ por lo que se aceptó que no hay homogeneidad entre las varianzas y se aplicó el test de Welch.

El test de Welch arrojó un nivel de significación $< 0,05$ por lo que se acepta que hay diferencias significativas entre las medias.

Por último se utilizó la prueba de Games-Howell para comparar los grupos dos a dos (Tabla 18).

Tabla 18. Grupos experimentales y valores de P del análisis de imagen para el ensayo de apoptosis. Grupo 24h frente a los Grupos 48h, 72h y 96h. Grupo 48h frente a los Grupos 24h, 72h y 96h, Grupo 72h frente a los Grupos 24h, 48h y 96h y Grupo 96h frente a los Grupos 24h, 48h y 72h.

Grupos	P<
24h - 48h	0,0005*
24h - 72h	0,0005*
24h - 96h	0,0005*
48h - 24h	0,0005*
48h - 72h	0,0005*
48h - 96h	0,001*
72h - 24h	0,0005
72h - 48h	0,0005*
72h - 96h	0,983
96h - 24h	0,0005*
96h - 48h	0,001*
96h - 72h	0,983

*Se considera estadísticamente significativo un valor del nivel de significación $p < 0,05$

2. In Vivo

2.1. En animales de experimentación (Ratas)

2.1.1. Parte Descriptiva De Los Resultados

Los animales se introducen en la cámara en grupos de 5-6. Una vez que la cámara está cerrada herméticamente, se procede a obtener la concentración de oxígeno y el grado de humedad deseado que se controlan de forma periódica al igual que los parámetros basales: concentración de O₂, CO₂, humedad, temperatura, flujo, presión de la botella, así como la sintomatología clínica.

En función de los cuartiles se observa que el 25% del total de los animales de experimentación sobreviven más de 86,5 horas. El 25 % de los animales que respiraron oxígeno seco viven más de 87 horas, más de 70.50 h los que respiraron oxígeno húmedo y 144 h para el grupo control. (Tabla 19).

Tabla 19. Horas de supervivencia, valores de los cuartiles.

	Cuartil 25	Cuartil 50	Cuartil 75
SECO	67,00	73,00	87,00
HÚMEDO	51,50	59,00	70,50
CONTROL	72,00	86,00	144,00
TOTAL	59,00	70,50	86,50

2.1.2. Análisis Anatomopatológico

Las lesiones que presentan los animales del grupo seco (humedad media del 30%) son similares en gravedad a las del grupo húmedo (humedad media del 90%) pero afectan a una menor superficie alveolar. Sin embargo los animales que sobrevivieron junto a los controles presentan predominantemente lesiones de tipo intersticial que no son letales y que no tienen lugar en el resto de animales. (Tabla 20)

Tabla 20. Análisis anatomopatológico.

Caso	Edema intraalveolar/edema perivascular	Congestión/ hemorragia	Inflamación	Lesión intersticial
Animales supervivientes grupo seco 184 h	Si, focal + (escasa)	Moderada	Exudación granulocítica baja	Si. Lesión predominante +++
O ₂ seco	Si, ++, con edema perivascular	Moderada	Si, aguda	No
O ₂ húmedo	Si, ++, (intraalveolar), edema perivascular	Alta	Aguda, baja	No
Control	Si, focal +	Si, leve	Si, aguda y crónica	Si, +++

+: afectación de 10-25%

++: afectación de 25-50%

+++ : afectación de 51-100%

MA: macrófagos intraalveolares

2.1.3. Análisis Estadístico De Los Resultados

La estadística indica que existe una diferencia significativa entre el grupo seco y húmedo ($P < 0,059$). (Tabla 21)

Los animales del grupo control (humedad media del 57%) presentan una supervivencia, superior a los otros dos grupos siendo el grupo húmedo (humedad media del 90%) el que menos supervivencia media presentó, siendo estas diferencias significativas ($p = 0,01$). (Tabla 22)

Tabla 21. Análisis estadístico (ANOVA) de la hora de fallecimiento de los animales.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P
Inter-grupos	1219,364	2	609,682	3,009	0,059
Intra-grupos	9929,328	49	202,639		
Total	11148,692	51			

Tabla 22. Análisis de las horas de supervivencia en función del ambiente de respiración del oxígeno.

Grupos	N	Horas	DT	IC al 95%		Mínimo	Máximo	F	P
Seco	22	87,27	34,362	72,04	102,51	61	168		
Húmedo	27	64,19	15,707	57,97	70,40	45	99	8,301	0,01
Control	11	103,18	40,323	76,09	130,27	50	144		
Total	60	79,80	32,232	71,47	88,13	45	168		

DT: Desviación típica

Al realizar el análisis de las diferencias de las horas de supervivencias entre los distintos grupos del estudio, se aprecia como las encontradas entre los grupos seco y control, 15,909 horas, son favorables al grupo control, pero no son significativas ($p= 0,335$). Las diferencias encontradas entre el grupo húmedo con el grupo seco y control sí son significativas estadísticamente, el grupo seco tiene una supervivencia media de 23,088 horas superior al húmedo y éste una supervivencia de 39,997 horas menos que el control. (Tabla 23).

Tabla 23. Comparaciones múltiples del tiempo de supervivencia en función del ambiente de oxígeno respirado.

TIPO OXÍGENO	Diferencia de Medias	IC 95%	P
Seco-Húmedo	23,088	2,25 – 43,92	0,026
Húmedo-Control	-38,997	-64,94 - -13,05	-0,002
Control-Seco	15,909	-10,88 – 42,69	0,335

IC: Intervalo de Confianza

Del total de los 60 animales utilizados hubo 8 (13,3%) supervivientes que fueron sacrificados; ningún animal que respiró oxígeno húmedo sobrevivió a la experiencia, frente a 3 del grupo seco y 5 ratas pertenecientes al grupo control.

Analizando la supervivencia de los animales en función del tipo de oxígeno respirado, húmedo o seco, tomando como referencia el grupo control, la frecuencia de mortandad de las ratas que respiran oxígeno seco, 86,4%, es superior a la de las controles, 54,5%, y la probabilidad de morir es 1,583 veces más frecuente, pero las diferencias no son estadísticamente significativas, $p: 0,114$. (Tabla 24)

Tabla 24. Diferencia de supervivencia entre el ambiente seco y los controles.

	Muertos	Vivos	Total	CHI ²	RR (IC 95%)	P
Seco	19(86,4%)	3(13,6%)	22			
Control	6(54,5%)	5(45,5%)	11	2,496	1,583 (0,900-2,784)	0,114
TOTAL	25(75,8%)	8(24,2%)	33			

RR: Riesgo relativo IC: Intervalo de Confianza

Comparando la supervivencia del grupo de oxígeno en ambiente húmedo con los controles, en la tabla 6 podemos observar que las diferencias de frecuencias de supervivencias son muy significativas estadísticamente, 45,5% en el grupo control frente al 0% en el grupo húmedo, $p: 0,001$, resultado un riesgo casi dos veces superior de morir, RR: 1,833, las que respiran en ambiente húmedo. (Tabla 25)

Tabla 25. Diferencia de supervivencia entre el ambiente húmedo y los controles.

	MUERTOS	VIVOS	TOTAL	CHI ²	RR (IC 95%)	P
Húmedo	27(100%)	0	27	10,434	1,833 1,069-3,144	0,001
Control	6(54,5%)	5(45,5%)	11			
TOTAL	33(86,8%)	5(13,2%)	38			

RR: Riesgo relativo IC: Intervalo de Confianza

2.2. En Humanos (Buceadores)

2.2.1. Parte Descriptiva De Los Resultados

Se incluyeron quince buceadores profesionales del Centro de Buceo de la Armada Española en este estudio. Todos los sujetos estaban sanos, sin enfermedad renal, hepática o diabetes en su historial clínico personal. Todos los individuos dieron su consentimiento para la realización de este estudio.

2.2.1.1. Edad

Las edades oscilaron entre los 27 y los 34 años con una media de $31,1 \pm 2,5$.

2.2.1.2. Talla

El rango de valores de la talla de los alumnos queda comprendido entre 171 cms, la talla mínima, y los 184 cms de un alumno, que corresponde a la talla máxima, con una media de $178,5 \pm 5,3$ cms.

2.2.1.3. Peso

Los alumnos fueron pesados al inicio, en la mitad y al final del curso, presentando un peso medio inicial de $82,6 \pm 6,8$ kilos, el peso medio en mitad del curso fue de $77,3 \pm 6,2$ mientras que el peso al final del curso fue de $77,7 \pm 6,9$ kilos.

2.2.1.4. Índice de masa corporal (IMC)

El valor medio del IMC al inicio del curso fue de $27,14 \pm 4,1$, en la mitad fue de $24,48 \pm 1,8$ y al final del curso de $22,38 \pm 1,8$. Los rangos de valores del IMC oscilan entre 22, valor mínimo, y 28 el máximo.

2.2.1.5. Alergias

En la anamnesis realizada a los alumnos, se detectaron la existencia de antecedentes clínicos a procesos alérgicos en 2 sujetos:

- 1 a sulfamidas
- 1 a sulfamidas y a ampicilina

2.2.1.6. Actividad Física

En relación al deporte practicado, el 90% de los individuos, 9 alumnos, realizan actividades fundamentalmente aeróbicas, carrera continua, mientras que el 10% restante no practica ejercicio.

En la tabla 26, aparece reflejada el número de horas que los alumnos dedicaban a la práctica del deporte.

2.2.1.7. Hábito Tabáquico

- **Número de cigarrillos diarios**

Nueve de los alumnos son no fumadores sólo uno es fumador. Este individuo fuma de 15 a 20 cigarrillos al día. (Tabla 26)

- **Tiempo fumando**

En función del tiempo fumando, aparece sólo un sujeto fumador que lo hace desde 10-15 años, otro que lo dejó hace 1 año. El resto de la muestra no fuma. (Tabla 26)

2.2.1.8. Categoría Militar

Dentro de las categorías militares, los alumnos están representados en tres categorías militares, cabos, suboficiales y oficiales, estando distribuida la muestra, por orden de frecuencia:

- 2 (20%) alumnos, con categoría de cabo
- 2 (20%) alumnos, con categoría de suboficial
- 6 (60%) alumnos, con categoría de oficial

2.2.1.9. Dieta

El 100% de los alumnos siguen una dieta mediterránea equilibrada y variada. Durante la duración del curso comieron en el comedor del Centro de Buceo de la Armada.

Tabla 26. Distribución por frecuencias y grupos de las variables cualitativas.

Variable	Grupo	Momento de la medida	Intervalo	Número sujetos	%
Grupos de edades (años)	0		$>27 \leq 30$	4	40
	1		$\geq 30 \leq 35$	6	60
Índice Masa Corporal	0	Inicio Curso	$\geq 22 \leq 25$	4	40
	1		$>25 \leq 30$	5	50
	2		>30	1	10
	0	Mitad Curso	$\geq 22 \leq 25$	5	50
	1		$>25 \leq 30$	5	50
	2		>30	0	0
	0	Final Curso	$\geq 22 \leq 25$	5	50
	1		$>25 \leq 30$	5	50
	2		>30	0	0
Horas de deporte a la semana	0		No practica	1	10
	1		<10	1	10
	2		$\geq 10 \leq 15$	5	50
	3		>15	3	30
Número cigarrillos/día	0		No fumadores	9	90
	1		15 - 20	1	10
Años Fumando	0		No fumador	9	90
	1		10 - 15	1	10
Presión Sanguínea	0	Inicio Curso	Sistólica: $\geq 110 \leq 130$	3	30
	1		Sistólica: $>130 \leq 150$	7	70
	2		Diastólica: $\geq 70 \leq 80$	6	60
	3		Diastólica: $>80 \leq 90$	4	40
	0	Mitad Curso	Sistólica: $\geq 110 \leq 130$	9	90
	1		Sistólica: $>130 \leq 150$	1	10
	2		Diastólica: $\geq 70 \leq 80$	9	90
	3		Diastólica: $>80 \leq 90$	1	10
	0	Final Curso	Sistólica: $\geq 110 \leq 130$	9	90
	1		Sistólica: $>130 \leq 150$	1	10
	2		Diastólica: <70	1	10
	3		Diastólica: $\geq 70 \leq 80$	9	90
	4		Diastólica: $>80 \leq 90$	0	0

2.2.1.10. Resultados de las analíticas

2.2.1.10.1. Leucocitos

El 100% de los alumnos presentaron unos valores de leucocitos dentro de los rangos normales. No se encontró ninguna tendencia significativa en los valores descriptivos leucocitarios a lo largo de las tres medidas recogidas. (Tabla 27)

Tabla 27. Valores descriptivos linfocitarios en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Leucocitos 1ª Medida	x 1000/uL	6,25	1,35	4,84	7,86
Leucocitos 2ª Medida	x 1000/uL	6,63	1,92	4,51	11,67
Leucocitos 3ª Medida	x 1000/uL	6,82	1,57	5,38	10,55

2.2.1.10.2. Hematíes

La mayoría de los alumnos no presentó ninguna anomalía en este parámetro. Únicamente uno de los sujetos mostró una alteración no significativa que quedaría por debajo del rango deseado ($4,5 - 6,5 \times 10^6/\mu\text{L}$), 4,46 en la primera medida y 4,32 en la segunda. En este parámetro no se apreció ninguna tendencia de variación en función a la exposición a oxígeno puro. (Tabla 28)

Tabla 28. Valores descriptivos de hematíes en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Hematíes 1ª Medida	x10 ⁶ /uL	4,97	0,31	4,46	5,45
Hematíes 2ª Medida	x10 ⁶ /uL	4,93	0,29	4,32	5,30
Hematíes 3ª Medida	x10 ⁶ /uL	5,08	0,32	4,7	5,74

2.2.1.10.3. Hemoglobina

No se apreciaron variaciones significativas o que salgan de los rangos normales en los alumnos a lo largo del estudio. Los valores medios de hemoglobina en las tres medidas estuvieron dentro de los rangos normales. (Tabla 29)

Tabla 29. Valores descriptivos de hemoglobina en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Hemoglobina 1ª Medida	g/dl	13,86	0,60	12,8	14,7
Hemoglobina 2ª Medida	g/dl	13,77	0,66	12,5	14,4
Hemoglobina 3ª Medida	g/dl	14,20	0,69	13	15,2

2.2.1.10.4. Hematocrito

Los valores medios del 90% de los sujetos no presentaron modificaciones con respecto al rango ideal. (Tabla 30)

Únicamente un individuo presentó un valor del 39,6% en la segunda media pero que no altera de forma significativa los resultados.

Tabla 30. Valores descriptivos del hematocrito en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Hematocrito 1ª Medida	%	42,72	1,48	40,9	45,5
Hematocrito 2ª Medida	%	42,71	1,76	39,6	45,3
Hematocrito 3ª Medida	%	43,33	1,48	41	45,8

2.2.1.10.5. Volumen Corpuscular Medio (VCM)

Dos alumnos presentaron valores inferiores a los normales. El primero de ellos presentó unos valores de 76,3, 77,4 y 75,4 fL en la primera, segunda y tercera medida respectivamente. Y el segundo 79,8, 79,8 y 78,7 fL en la primera, segunda y tercera medida respectivamente. En la tabla 31 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el VCM en cada uno de los sujetos.

Tabla 31. Valores descriptivos del VCM en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
VCM 1ª Medida	fL	86,15	4,90	76,3	92,2
VCM 2ª Medida	fL	86,92	4,96	77,4	92,8
VCM 3ª Medida	fL	85,55	5,00	75,4	91,2

2.2.1.10.6. Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)

Dos alumnos presentaron valores de HCM un 11% y un 7% inferiores a los normales. Los resultados para el primero de ellos fueron de 24,4, 24,3 y 24 pg en la primera, segunda y tercera medida. Para el segundo sujeto los valores obtenidos fueron 25,5, 25,3 y 25,4 pg para la primera, segunda y tercera medida respectivamente. No obstante estas variaciones individuales no repercuten de forma significativa en la HCM cuando el individuo es expuesto a condiciones hiperbáricas.

(Tabla 32)

Tabla 32. Valores descriptivos de la HCM en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
HCM 1ª Medida	pg	27,95	1,73	24,4	29,9
HCM 2ª Medida	pg	28,02	1,85	24,3	30,2
HCM 3ª Medida	pg	28,05	1,95	24	30,4

2.2.1.10.7. Concentración Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)

No se han observado resultados anormales en los buceadores para este parámetro. En la tabla 33 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para la CHCM en cada uno de los sujetos.

Tabla 33. Valores descriptivos de la CHCM en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
CHCM 1ª Medida	g/dl	32,45	0,97	31,1	34,5
CHCM 2ª Medida	g/dl	32,24	0,81	31,4	33,8
CHCM 3ª Medida	g/dl	32,77	0,96	31,7	34,6

2.2.1.10.8. Índice Dispersión Eritrocitaria (RDW)

Se apreció un RDW ligeramente superior al óptimo pero no significativo en un alumno en la tercera medida con un valor de 16,1%. En la tabla 34 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el RDW en cada uno de los sujetos.

Tabla 34. Valores descriptivos de la RDW en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
RDW 1ª Medida	%	13,23	0,86	12	15,1
RDW 2ª Medida	%	13,52	0,89	12,3	15,3
RDW 3ª Medida	%	13,59	1,08	12,3	16,1

2.2.1.10.9. Plaquetas

El 90% de los sujetos no mostró alteraciones en los resultados plaquetarios. Un alumno presentó un nivel levemente inferior al normal pero sin significación, 128 x1000/uL, en la primera medida. En la tabla 35 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para la CHCM en cada uno de los sujetos.

Tabla 35. Valores descriptivos plaquetarios en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Plaquetas 1ª Medida	x 1000/uL	190,1	33,04	128	238
Plaquetas 2ª Medida	x 1000/uL	219,40	38,92	157	286
Plaquetas 3ª Medida	x 1000/uL	189,70	19,84	160	212

2.2.1.10.10. Volumen Plaquetario Medio (VPM)

El 100% de los alumnos presentaron unos valores de volumen plaquetario medio dentro de los rangos normales. En la tabla 36 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el VPM en cada uno de los sujetos.

Tabla 36. Valores descriptivos del VPM en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
VPM 1ª Medida	fL	11,66	0,77	10,6	12,7
VPM 2ª Medida	fL	11,27	0,90	9,9	12,8
VPM 3ª Medida	fL	11,06	0,80	9,8	12,3

2.2.1.10.11. Plaquetocrito

Ningún alumno presentó resultados fuera del rango óptimo para el plaquetocrito. En la tabla 37 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el plaquetocrito en cada uno de los sujetos.

Tabla 37. Valores descriptivos del plaquetocrito en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Plaquetocrito 1ª Medida	%	0,22	0,03	0,16	0,27
Plaquetocrito 2ª Medida	%	0,25	0,05	0,19	0,33
Plaquetocrito 3ª Medida	%	0,21	0,02	0,18	0,24

2.2.1.10.12. Linfocitos %

Un sujeto presentó un leve aumento (1%) en este parámetro en la segunda medida pero que no llega a ser significativo. En otro alumno se obtuvo un déficit de un 3,5% en la primera medida. Y un tercero mostró unos porcentajes linfocitarios del 45,1 y del 46,8% en la primera y segunda medida respectivamente. En la tabla 38 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el porcentaje de linfocitos en cada uno de los sujetos.

Tabla 38. Valores descriptivos del porcentaje linfocitario en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Linfocitos % 1ª Medida	%	31,18	7,40	18,5	45,1
Linfocitos % 2ª Medida	%	37,57	6,16	31,5	46,8
Linfocitos % 3ª Medida	%	30,60	4,98	22,4	39,7

2.2.1.10.13. Neutrófilos %

Un buceador presentó un leve descenso de 1,7% en la primera medida de un 3,4% en la segunda pero sin significación. En la tabla 39 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el porcentaje de neutrófilos en cada uno de los sujetos.

Tabla 39. Valores descriptivos del porcentaje de neutrófilos en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Neutrófilos % 1ª Medida	%	57,80	8,83	44,3	74,1
Neutrófilos % 2ª Medida	%	51,16	4,88	41,6	56,7
Neutrófilos % 3ª Medida	%	59,45	5,12	50,1	66,3

2.2.1.10.14. Monocitos %

El 100% de los alumnos no mostró ninguna variación anormal en el porcentaje de monocitos sanguíneos. En la tabla 40 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el porcentaje de monocitos en cada uno de los sujetos.

Tabla 40. Valores descriptivos del porcentaje de monocitos en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Monocitos % 1ª Medida	%	7,18	1,44	4,5	8,9
Monocitos % 2ª Medida	%	7,44	1,37	5,5	9,1
Monocitos % 3ª Medida	%	6,61	1,31	3,7	8

2.2.1.10.15. Eosinófilos %

No se obtuvo resultados fuera de la normalidad para este parámetro en ninguno de los buceadores. En la tabla 41 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el porcentaje de eosinófilos en cada uno de los sujetos.

Tabla 41. Valores descriptivos del porcentaje de eosinófilos en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Eosinófilos % 1ª Medida	%	3,17	1,63	0,8	5,6
Eosinófilos % 2ª Medida	%	3,17	1,55	1,4	5,5
Eosinófilos % 3ª Medida	%	2,81	0,80	1,2	3,8

2.2.1.10.16. Basófilos %

Ninguno de los alumnos presentó valores anormales en el porcentaje de basófilos. En la tabla 42 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el porcentaje de basófilos en cada uno de los sujetos.

Tabla 42. Valores descriptivos del porcentaje de basófilos en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Basófilos % 1ª Medida	%	0,67	0,49	0,2	1,9
Basófilos % 2ª Medida	%	0,66	0,32	0,2	1,2
Basófilos % 3ª Medida	%	0,53	0,31	0,2	1,2

2.2.1.10.17. Linfocitos Valor Absoluto (LVA)

Se apreció un valor de 1,34/ml en un individuo en la primera media. Un segundo presentó un valor ligeramente superior al normal pero no significativo, 5,06% en la segunda medida. Y un tercero mostró valores por debajo de lo normal, 1,49% y 1,38% en la primera y tercera medida respectivamente sin significación. En la tabla 43 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el valor absoluto de linfocitos en cada uno de los sujetos.

Tabla 43. Descriptivos del valor absoluto de linfocitos en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
LVA 1ª Medida	/ml	1,90	0,45	1,34	2,68
LVA 2ª Medida	/ml	2,52	0,99	1,73	5,06
LVA 3ª Medida	/ml	2,07	0,51	1,38	3,21

2.2.1.10.18. Neutrófilos Valor Absoluto (NVA)

No se apreció ninguna alteración en el valor absoluto de neutrófilos en los individuos. En la tabla 44 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el NVA en cada uno de los sujetos.

Tabla 44. Descriptivos del valor absoluto de neutrófilos en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
NVA 1ª Medida	x 1000/uL	3,67	1,26	2,44	5,14
NVA 2ª Medida	x 1000/uL	3,38	0,93	2,33	5,62
NVA 3ª Medida	x 1000/uL	4,07	1,05	2,74	6,35

2.2.1.10.19. Monocitos Valor Absoluto (MVA)

En ningún alumno se produce alteración en el rango de este parámetro. En la tabla 45 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el MVA en cada uno de los sujetos.

Tabla 45. Descriptivos del valor absoluto de monocitos en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
MVA 1ª Medida	x 1000/uL	0,44	0,09	0,34	0,66
MVA 2ª Medida	x 1000/uL	0,48	0,10	0,33	0,64
MVA 3ª Medida	x 1000/uL	0,45	0,13	0,25	0,65

2.2.1.10.20. Eosinófilos Valor Absoluto (EVA)

No hay modificaciones en la determinación del valor absoluto de eosinófilos en los buceadores. En la tabla 46 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el EVA en cada uno de los sujetos.

Tabla 46. Descriptivos del valor absoluto de eosinófilos en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
EVA 1ª Medida	/ml	0,20	0,12	0,06	0,36
EVA 2ª Medida	/ml	0,21	0,10	0,08	0,33
EVA 3ª Medida	/ml	0,20	0,08	0,07	0,32

2.2.1.10.21. Basófilos Valor Absoluto (BVA)

Las determinaciones de los valores absolutos de basófilos de los alumnos fueron completamente normales. En la tabla 47 se muestra los datos descriptivos de medias y desviaciones de las tres medidas realizadas para el BVA en cada uno de los sujetos.

Tabla 47. Descriptivos del valor absoluto de basófilos en las tres determinaciones tomadas en buceadores de combate.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
BVA 1ª Medida	/ml	0,04	0,02	0,02	0,09
BVA 2ª Medida	/ml	0,04	0,02	0,01	0,07
BVA 3ª Medida	/ml	0,03	0,02	0,02	0,07

Las tablas 48, 49 y 50 recogen un resumen de los valores medios de los parámetros hematológicos medidos.

Tabla 48. Análisis general de la descriptiva de las analíticas sanguíneas de los buceadores en la **primera** determinación.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Leucocitos	x 1000/uL	6,25	1,35	4,84	7,86
Hematíes	x10 ⁶ /uL	4,97	0,31	4,46	5,45
Hemoglobina	g/dl	13,86	0,60	12,8	14,7
Hematocrito	%	42,72	1,48	40,9	45,5
Volumen corpuscular medio	fL	86,15	4,90	76,3	92,2
Hemoglobina corpuscular media	pg	27,95	1,73	24,4	29,9
Concentración Hemoglobina corpuscular media	g/dl	32,45	0,97	31,1	34,5
Ind. Dispersión eritrocitaria	%	13,23	0,86	12	15,1
Plaquetas	x 1000/uL	190,1	33,04	128	238
Volumen plaquetario medio	fL	11,66	0,77	10,6	12,7
Plaquetocrito	%	0,22	0,03	0,16	0,27
Linfocitos %	%	31,18	7,40	18,5	45,1
Neutrófilos %	%	57,80	8,83	44,3	74,1
Monocitos %	%	7,18	1,44	4,5	8,9
Eosinófilos %	%	3,17	1,63	0,8	5,6
Basófilos %	%	0,67	0,49	0,2	1,9
Linfocitos valor absoluto	/ml	1,90	0,45	1,34	2,68
Neutrófilos valor absoluto	x 1000/uL	3,67	1,26	2,44	5,14
Monocitos valor absoluto	x 1000/uL	0,44	0,09	0,34	0,66
Eosinófilos valor absoluto	/ml	0,20	0,12	0,06	0,36
Basófilos valor absoluto	/ml	0,04	0,02	0,02	0,09

D.S. Desviación típica

Tabla 49. Análisis general de la descriptiva de las analíticas sanguíneas de los buceadores en la **segunda** determinación.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Leucocitos	x 1000/uL	6,63	1,92	4,51	11,67
Hematíes	x10 ⁶ /uL	4,93	0,29	4,32	5,30
Hemoglobina	g/dl	13,77	0,66	12,5	14,4
Hematocrito	%	42,71	1,76	39,6	45,3
Volumen corpuscular medio	fL	86,92	4,96	77,4	92,8
Hemoglobina corpuscular media	pg	28,02	1,85	24,3	30,2
Concentración Hemoglobina corpuscular media	g/dl	32,24	0,81	31,4	33,8
Ind. Dispersión eritrocitaria	%	13,52	0,89	12,3	15,3
Plaquetas	x 1000/uL	219,40	38,92	157	286
Volumen plaquetario medio	fL	11,27	0,90	9,9	12,8
Plaquetocrito	%	0,25	0,05	0,19	0,33
Linfocitos %	%	37,57	6,16	31,5	46,8
Neutrófilos %	%	51,16	4,88	41,6	56,7
Monocitos %	%	7,44	1,37	5,5	9,1
Eosinófilos %	%	3,17	1,55	1,4	5,5
Basófilos %	%	0,66	0,32	0,2	1,2
Linfocitos valor absoluto	/ml	2,52	0,99	1,73	5,06
Neutrófilos valor absoluto	x 1000/uL	3,38	0,93	2,33	5,62
Monocitos valor absoluto	x 1000/uL	0,48	0,10	0,33	0,64
Eosinófilos valor absoluto	/ml	0,21	0,10	0,08	0,33
Basófilos valor absoluto	/ml	0,04	0,02	0,01	0,07

D.S. Desviación típica

Tabla 50. Análisis general de la descriptiva de las analíticas sanguíneas de los buceadores en la **tercera** determinación.

Parámetro	Unidad	Media	D.S.	Mínimo	Máximo
Leucocitos	x 1000/uL	6,82	1,57	5,38	10,55
Hematíes	x10 ⁶ /uL	5,08	0,32	4,7	5,74
Hemoglobina	g/dl	14,20	0,69	13	15,2
Hematocrito	%	43,33	1,48	41	45,8
Volumen corpuscular medio	fL	85,55	5,00	75,4	91,2
Hemoglobina corpuscular media	pg	28,05	1,95	24	30,4
Concentración Hemoglobina corpuscular media	g/dl	32,77	0,96	31,7	34,6
Ind. Dispersión eritrocitaria	%	13,59	1,08	12,3	16,1
Plaquetas	x 1000/uL	189,70	19,84	160	212
Volumen plaquetario medio	fL	11,06	0,80	9,8	12,3
Plaquetocrito	%	0,21	0,02	0,18	0,24
Linfocitos %	%	30,60	4,98	22,4	39,7
Neutrófilos %	%	59,45	5,12	50,1	66,3
Monocitos %	%	6,61	1,31	3,7	8
Eosinófilos %	%	2,81	0,80	1,2	3,8
Basófilos %	%	0,53	0,31	0,2	1,2
Linfocitos valor absoluto	/ml	2,07	0,51	1,38	3,21
Neutrófilos valor absoluto	x 1000/uL	4,07	1,05	2,74	6,35
Monocitos valor absoluto	x 1000/uL	0,45	0,13	0,25	0,65
Eosinófilos valor absoluto	/ml	0,20	0,08	0,07	0,32
Basófilos valor absoluto	/ml	0,03	0,02	0,02	0,07

D.S. Desviación típica

2.2.1.11. Resultados del Estado Antioxidante total

Se observó un descenso generalizado en los parámetros evaluados al final del estudio. El estado antioxidante total disminuyó tras 6 semanas (media 1.38 versus 1.23 Mohs/l), con aumento leve al final (media 1.31 Mohs/l). (Tabla 51)

2.2.1.12. Resultados del NO

El NO mostró niveles más altos al principio del estudio y fue más bajo después de 6 y 12 semanas del curso. (Tabla 51)

2.2.1.13. Resultados de GPx e Isoprostanos

Además, la GPx y los F₂-isoprotanos fueron progresivamente más bajos (Tabla 51).

Tabla 51. Comparación descriptiva entre parámetros del estrés oxidativo y el NO a lo largo del estudio.

	Semana 0 (1ª Medida)	6ª Semana (2ª Medida)	Semana 12ª (3ª Medida)
NO (µM)	49.61 ± 19.86	36.99 ± 8.82	35.85 ± 6.82
TAS (mmol/l)	1.38 ± 0.06	1.23 ± 0.05	1.31 ± 0.06
GPx (mg/l)	17.68 ± 11.69	14.18 ± 7.94	10.74 ± 7.67
F₂ isoprostanos (µg/g creat)	5.17 ± 4.74	2.93 ± 2.38	2.14 ± 1.98

La estadística descriptiva está representada como la media ± desviación estándar.

TAS = Estado Antioxidante Total.

GPx = Glutation Peroxidasa.

NO = Oxido Nítrico.

N = 15

2.2.2. Análisis Estadístico De Los Resultados

Las medias fueron comparadas con un análisis de la varianza de medidas repetidas. Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas.

Los parámetros de leucocitos, hematíes, hemoglobina, hematocrito, hemoglobina corpuscular media y la concentración de hemoglobina corpuscular media, además del porcentaje de monocitos, eosinófilos y basófilos, así como el valor absoluto de éstos mismos, no experimentaron cambios significativos con la exposición de oxígeno al 100%.

2.2.2.1. Volumen Corpuscular Medio (VCM)

Este parámetro sufre una alteración estadística de significación. (Tabla 52)

Dicha variación es de orden cuadrático o lo que es lo mismo, responde a una campana de Gauss.

Tabla 52. Análisis Estadístico del VCM. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Factor	Lineal	1,800	1	1,800	2,344	0,160
	Cuadrático	7,633	1	7,633	14,645	0,004
Error	Lineal	6,910	9	0,768		
	Cuadrático	4,691	9	0,521		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

2.2.2.2. Índice de Dispersión Eritrocitaria (RDW)

Este parámetro sufre una alteración estadística de significación. (Tabla 53).

Esta variación es de orden lineal.

Tabla 53. Análisis Estadístico del RDW. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Factor	Lineal	0,648	1	0,648	8,945	0,015
	Cuadrático	0,081	1	0,081	2,182	0,174
Error	Lineal	0,652	9	0,072		
	Cuadrático	0,333	9	0,037		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

2.2.2.3. Plaquetas

Este parámetro sufre una alteración estadística de significación. (Tabla 54)

Esta variación es de orden cuadrático.

Tabla 54. Análisis Estadístico Plaquetario. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Factor	Lineal	0,800	1	0,800	0,002	0,968
	Cuadrático	5801,667	1	5801,667	18,176	0,002
Error	Lineal	4196,200	9	466,244		
	Cuadrático	2872,667	9	319,185		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

2.2.2.4. Volumen Plaquetario Medio (VPM)

Este parámetro sufre una alteración estadística de significación. (Tabla 55)

Esta variación es de orden lineal y cuadrático.

Tabla 55. Análisis Estadístico del VPM. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Factor	Lineal	1,620	1	1,620	49,846	0,005
	Cuadrático	0,392	1	0,392	5,454	0,048
Error	Lineal	0,260	8	0,033		
	Cuadrático	0,575	8	0,072		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

2.2.2.5. Plaquetocrito

Este parámetro sufre una alteración estadística de significación. (Tabla 56)

Esta variación es de orden cuadrático.

Tabla 56. Análisis Estadístico del plaquetocrito. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Factor	Lineal	0,005	1	0,005	0,487	0,505
	Cuadrático	0,004	1	0,004	9,514	0,015
Error	Lineal	0,006	8	0,001		
	Cuadrático	0,003	8	0,005		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

2.2.2.6. Linfocitos %

Este parámetro sufre una alteración estadística de significación. (Tabla 57)

Esta variación es de orden cuadrático.

Tabla 57. Análisis Estadístico del porcentaje de linfocitos. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Factor	Lineal	1,682	1	1,682	0,077	0,788
	Cuadrático	297,483	1	297,483	23,747	0,001
Error	Lineal	197,798	9	21,978		
	Cuadrático	112,744	9	12,527		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

2.2.2.7. Neutrófilos %

Este parámetro sufre una alteración estadística de significación. (Tabla 58)

Esta variación es de orden cuadrático.

Tabla 58. Análisis Estadístico del porcentaje de neutrófilos. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Factor	Lineal	13,613	1	13,613	0,495	0,500
	Cuadrático	371,508	1	371,508	32,418	0,005
Error	Lineal	247,733	9	27,526		
	Cuadrático	103,140	9	11,460		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

2.2.2.8. Linfocitos Valor Absoluto (LVA)

Este parámetro sufre una alteración estadística de significación. (Tabla 59)

Esta variación es de orden cuadrático.

Tabla 59. Análisis Estadístico de LVA. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Factor	Lineal	0,139	1	0,139	1,425	0,263
	Cuadrático	1,890	1	1,890	6,834	0,028
Error	Lineal	0,881	9	0,098		
	Cuadrático	2,490	9	0,277		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

2.2.2.9. Neutrófilos Valor Absoluto (NVA)

Este parámetro sufre una alteración estadística de significación. (Tabla 60)

Esta variación es de orden cuadrático.

Tabla 60. Análisis Estadístico de NVA. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Factor	Lineal	0,764	1	0,764	1,148	0,312
	Cuadrático	1,630	1	1,630	4,919	0,054
Error	Lineal	5,993	9	0,666		
	Cuadrático	2,982	9	0,331		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

2.2.2.10. Óxido Nítrico (NO)

Este parámetro sufre una alteración estadística de significación. (Tabla 61)

Esta variación es de orden lineal y cuadrático.

Tabla 61. Análisis Estadístico del NO. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Factor	Lineal	3669,341	1	3669,341	21,852	0,001
	Cuadrático	1416,010	1	1416,010	18,363	0,002
Error	Lineal	1511,240	9	167,916		
	Cuadrático	694,022	9	77,114		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

2.2.2.11. Estado Antioxidante Total (TAS)

Este parámetro sufre una alteración estadística de significación. (Tabla 62)

Esta variación es de orden lineal y cuadrático.

Tabla 62. Análisis Estadístico del TAS. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Factor	Lineal	0,105	1	0,105	85,045	0,005
	Cuadrático	0,143	1	0,143	107,896	0,005
Error	Lineal	0,011	9	0,001		
	Cuadrático	0,012	9	0,001		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

2.2.2.12. Glutación Peroxidasa (GPx)

Este parámetro sufre una alteración estadística de significación. (Tabla 63)

Esta variación es de orden lineal.

Tabla 63. Análisis Estadístico de la GPx. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Factor	Lineal	98,036	1	98,036	8,195	0,019
	Cuadrático	7,719	1	7,719	0,417	0,534
Error	Lineal	107,671	9	11,963		
	Cuadrático	166,501	9	18,500		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas

2.2.2.13. Isoprostanos

Este parámetro sufre una alteración estadística de significación. (Tabla 64)

Esta variación es de orden lineal y cuadrático.

Tabla 64. Análisis Estadístico de los isoprostanos. Pruebas de contrastes intra-sujetos.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	P
Factor	Lineal	14,965	1	14,965	19,892	0,002
	Cuadrático	1,568	1	1,568	6,605	0,030
Error	Lineal	6,771	9	0,752		
	Cuadrático	2,137	9	0,237		

Las diferencias con una p inferior a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas



DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

1 Sobre el cultivo de neumocitos

Las lesiones y su posterior recuperación de las células alveolares epiteliales cultivadas in Vitro ocasionadas por la exposición a hiperoxia han sido estudiadas durante décadas, pero sólo recientemente se ha llegado a la conclusión de que el daño que se produce en las mismas en atmósferas saturadas de oxígeno tiene lugar debido a un mecanismo coordinado de activación de genes que acabarían por determinar las lesiones que en última instancia aparecerían en el pulmón. Este complejo mecanismo de activación de genes tiene influencia directa sobre la viabilidad y crecimiento de las células pulmonares entre ellas los neumocitos tipo II^{203, 204} ya que son las células alveolares epiteliales más expuestas junto con los neumocitos tipo I a los gases que difunden por el alveolo. Por ello, se estudió la viabilidad y crecimiento de neumocitos tipo II In Vitro en condiciones hiperóxicas. (Tablas 2-5; 8-11) (Fig. 4-7)

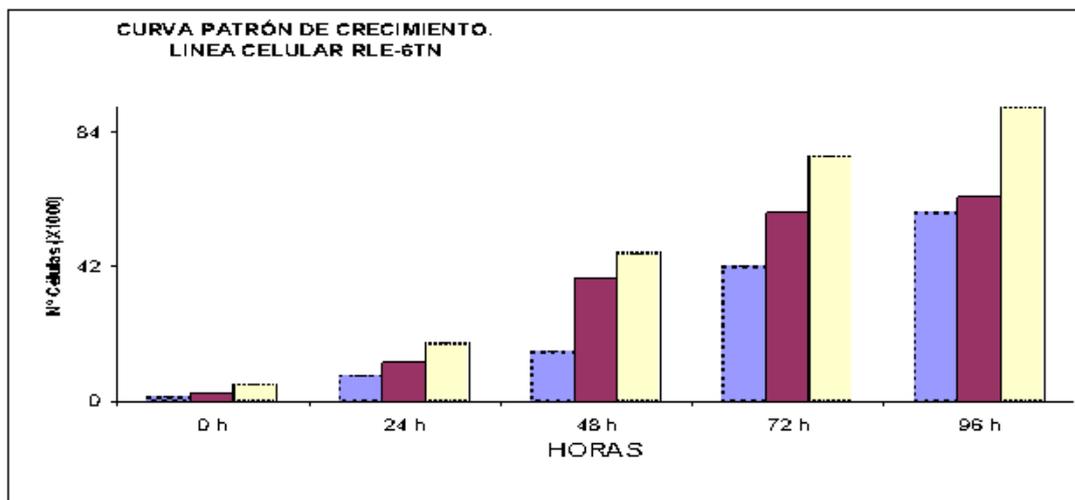


Figura 4. Curva patrón de crecimiento de un cultivo de neumocitos tipo II en condiciones normales según el ensayo del MTT.

La liberación de ATP que se produce en la células bajo determinados estímulos como son las condiciones hiperóxicas, puede activar importantes rutas de supervivencia celular. La ruta de señalización vía TOR es una de ellas. La molécula TOR (diana para la rapamicina) en mamíferos, corresponde a un sensor energético homeostático y a un importante mediador del crecimiento y proliferación celular. Una característica importante en la supervivencia de la célula en condiciones hiperóxicas es un aumento en la utilización de la glucosa. Tanto el ATP extracelular como la hiperoxia son importantes señales autocrinas y paracrinas de modulación de la función celular por medio de un aumento en la activación de los receptores de membrana P_2 dependiente de los niveles de glucosa en las células pulmonares. Éstos receptores son activados por nucleótidos transmitiendo una señal al interior de la célula que puede ser la generación de segundos mensajeros. La consecuencia de la activación de estos receptores es la modificación de la fisiología del tejido que los presenta. Se ha observado que durante la adaptación a la hiperoxia se produce un aumento en la utilización de la glucosa que mantendría los niveles de ATP celulares y por tanto la supervivencia de la célula. Así, la ruta de señalización que se pone en marcha en condiciones hiperóxicas consistiría en la activación de los receptores de membrana P_2 por parte del ATP extracelular generado por un aumento en la utilización de la glucosa que a su vez activaría la ruta de mTOR. El cual desencadenaría toda una ruta de señalización intracelular mediada por la kinasa p70S6K que estimularía la supervivencia de la célula²⁰⁵. (Fig. 11)

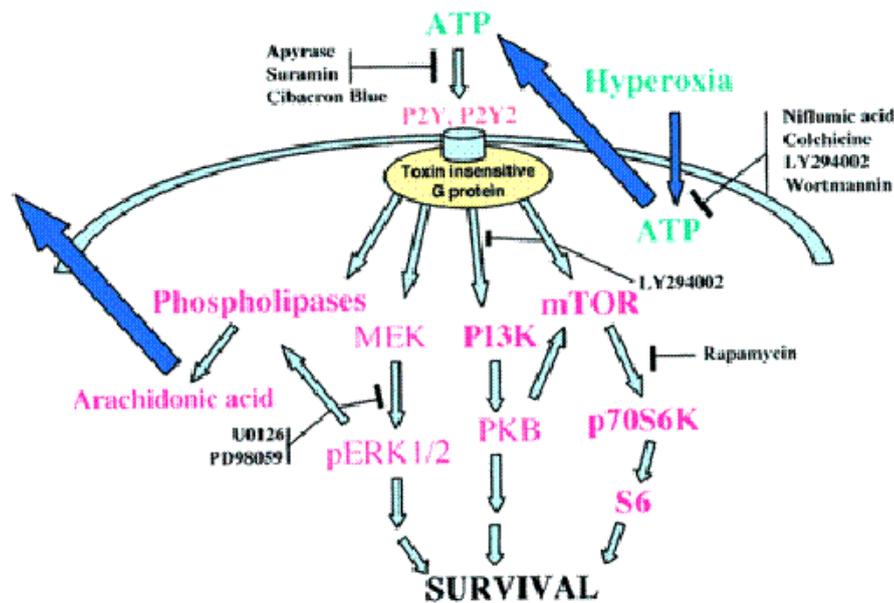


Fig. 11. Ruta de señalización mTOR inducida por hiperoxia²⁰⁵.

Se observó que la exposición a hiperoxia durante 24 horas de neumocitos tipo II no parece interferir de forma importante en su crecimiento y viabilidad incluso en algún caso aumenta (Tablas 3 y 4) (Fig 5 y 6). A partir de las 48 horas de exposición y hasta las 96 horas se produce un descenso significativo en la viabilidad y crecimiento de estas células^{206, 207}. Este hecho podría deberse a que los niveles de oxidantes producidos tras 24 horas de exposición a hiperoxia son compensados por los sistemas antioxidantes endógenos ya que se ha demostrado que los niveles de glutatión y la actividad de las enzimas asociadas con la protección antioxidante en el pulmón, aumentan en respuesta a la hiperoxia²⁰⁸. Efectivamente en homogenados de pulmón y en neumocitos tipo II aislados de rata expuestos a elevadas concentraciones de oxígeno aumentan los niveles de moléculas y agentes oxidantes, y a su vez, dicho aumento conlleva un incremento de la actividad de los enzimas antioxidante. Para combatir el daño oxidativo producido por la hiperoxia, la célula

pulmonar está preparada con todo un arsenal de enzimas antioxidantes, algunos de los más importantes son la superóxido dismutasa y la catalasa encargados de la eliminación de las especies reactivas de oxígeno tales como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. Pero estas células además cuentan con la NADH deshidrogenasa mitocondrial, con la citocromo c reductasa de NADPH derivada del retículo endoplasmático y con la óxido xantina reductasa citosólica²⁰⁹. No podemos olvidar mencionar la glutation (GSH) como enzima antioxidante que en las últimas décadas cobra cada vez más importancia como responsable de una mayor tolerancia al oxígeno en bebés recién nacidos y por tanto de ser la responsable en gran parte de compensar el exceso de sustancias oxidantes en el organismos ocasionadas por la hiperoxia^{210, 211}. Se infiere que bajo condiciones de altos niveles de hiperoxia (80%) la concentración de GSH en ratas es capaz de descender a valores bajos pero que, sin embargo, también es capaz de recuperarse y alcanzar niveles más altos que los normales, posiblemente como un mecanismo de defensa o un proceso adaptativo del organismo y probablemente ocurran efectos a otro nivel metabólico²¹². Clahsen demostró en bebés recién nacidos que los eritrocitos de estos niños eran capaces de restablecer las concentraciones del GSH durante el estrés oxidativo in Vitro utilizando H₂O₂. Estos investigadores encontraron un agotamiento rápido del GSH con acumulación concomitante de GSSG, seguido por una recuperación de GSH y la caída de la concentración de GSSG al valor inicial.

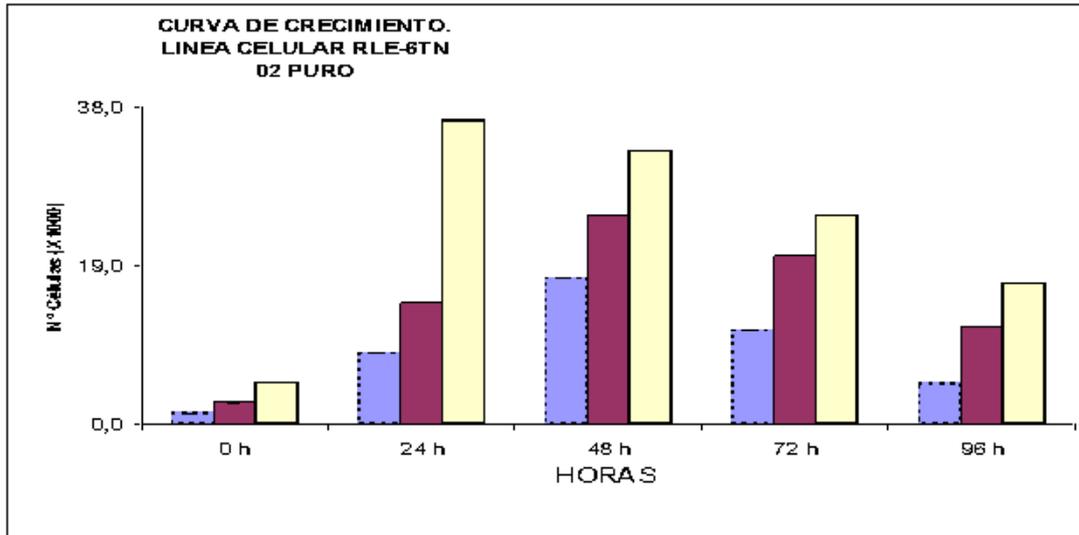


Figura 5. Curva de crecimiento de un cultivo de neumocitos tipo II en condiciones hiperóxicas según el ensayo del MTT.

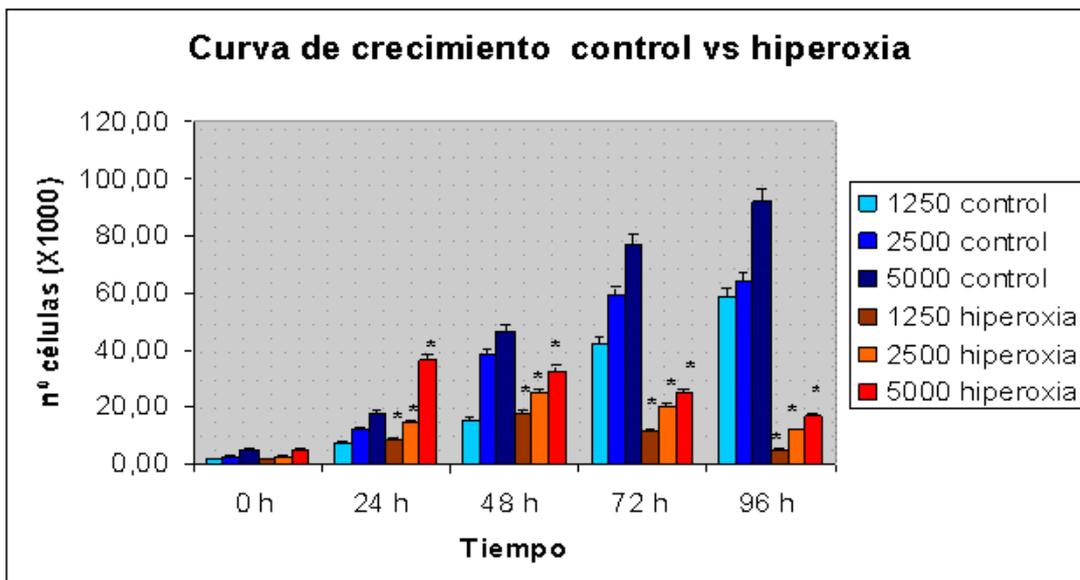


Figura 6. Curva de crecimiento celular a 1250, 2500 y 5000 células/pocillo en condiciones normales frente a condiciones hiperóxicas. (*) $P < 0,05$ frente al correspondiente control.

Se observó que a partir de las 48 horas de exposición la concentración de especies reactivas de oxígeno celulares es tan alta que los sistemas antioxidantes no son capaces de eliminarlos produciendo un descenso importante en la viabilidad y crecimiento del neumocito tipo II²¹¹.

La disminución de la viabilidad del neumocito podría estar también relacionada con el aumento de la muerte celular observada durante la exposición a hiperoxia ya que se ha demostrado que la concentración de ATP disminuye junto con una inhibición de la señal mTOR a partir de las 48 h de exposición. Por lo que se puede hablar de otra importante ruta de señalización dependiente de ATP²⁰⁵.

La capacidad de la lactato deshidrogenasa (LDH) de ser excretada al medio extracelular en caso de muerte celular y de transformar el lactato en una sustancia coloreada capaz de ser medida, es lo que hace que sea posible relacionarla con el porcentaje de muerte. En los cultivos en los que determinamos dicho fenómeno, el porcentaje de muerte celular en condiciones hiperóxicas aumenta significativamente en todos los casos en comparación con los cultivos realizados en condiciones normales aunque el aumento es considerablemente mayor a partir de las 48 horas de exposición^{213, 214}. (Tabla 5) (Fig 7)

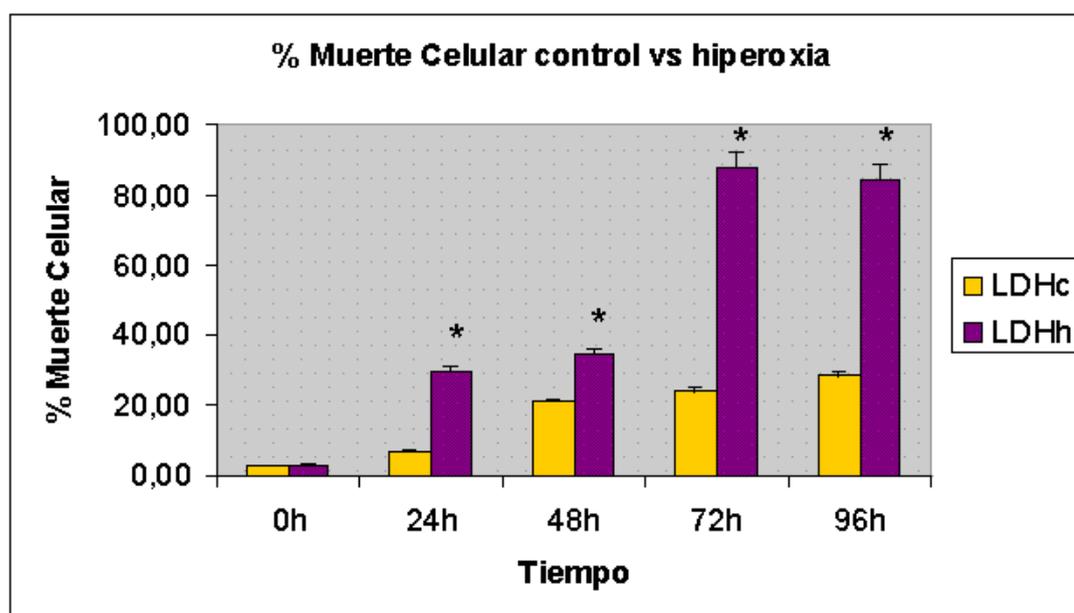


Figura 7. Porcentaje de muerte celular del grupo control frente al del grupo hiperóxico según el ensayo de LDH. (*) $P < 0,05$ frente a su correspondiente control.

Estos resultados parecen indicar que entre 24 y 48 horas de cultivo, las células son capaces de mantener el balance entre el porcentaje de muerte celular y la capacidad proliferativa²¹⁵. En un trabajo reciente se demuestra que tras 24 horas y hasta las 48 horas de exposición a la hiperoxia se activa el gen Akt produciendo en la célula un efecto protector frente al daño hiperóxico, al menos en parte, por mantener la integridad mitocondrial²¹⁶. A partir de las 48 horas de exposición las células comienzan a perder la alta capacidad de división, el porcentaje de muerte celular se acentúa y la densidad celular disminuye drásticamente. Estos resultados están de acuerdo con otros trabajos realizados sobre hiperoxia en neumocitos y otros tipos celulares^{217, 218, 219, 220}.

Con el fin de poder aclarar la causa de la muerte celular que se produce en condiciones hiperóxicas y pensando que podía atribuirse al daño oxidativo se midió las variaciones en la producción de radicales libre (ROS), a las 0, 24 y 48 horas la producción de ROS en las células hiperoxicas fue similar sin ninguna diferencia significativa. Es a partir de las 48 horas hasta las 96 cuando aumenta de forma significativa la producción de especies reactivas de oxígeno con respecto a los neumocitos que crecieron en condiciones normales (Tabla 6) (Fig 8), probablemente porque comienzan a acumularse de forma masiva en la célula ya que los sistemas antioxidantes de la misma que hasta las 48 horas han sido capaces de compensar el aumento del estado oxidante ya no muestran dicha eficacia como el caso de la síntesis de la glutatión que es inhibida en condiciones hiperóxicas²¹¹.

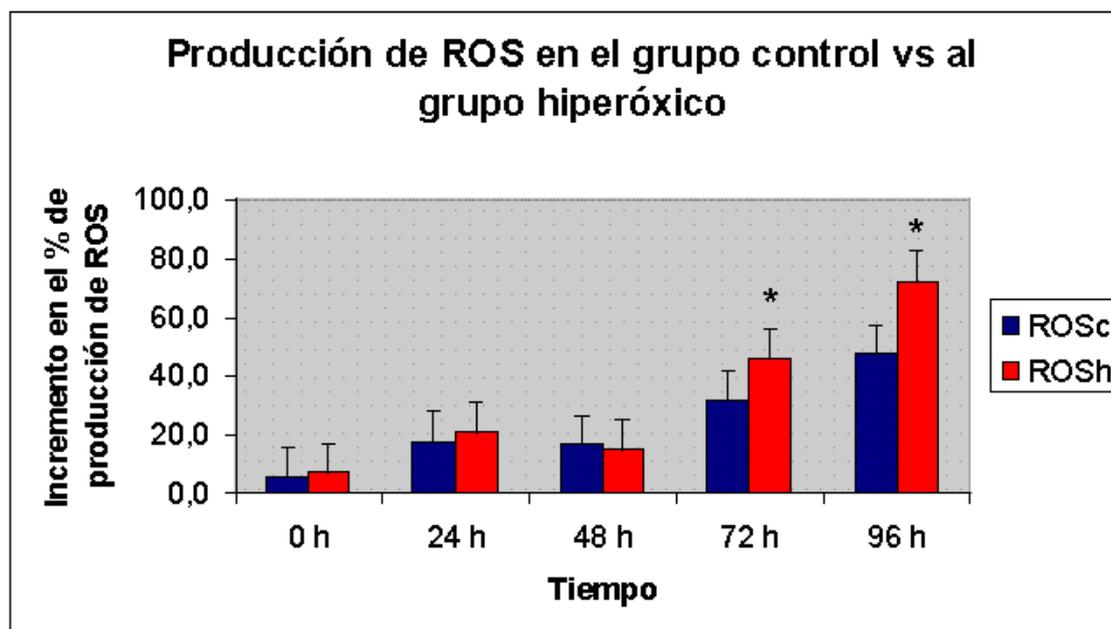


Figura 8. Representación gráfica de la producción de ROS en el grupo control frente al grupo hiperóxico. (*) $P < 0.05$ frente a su correspondiente control.

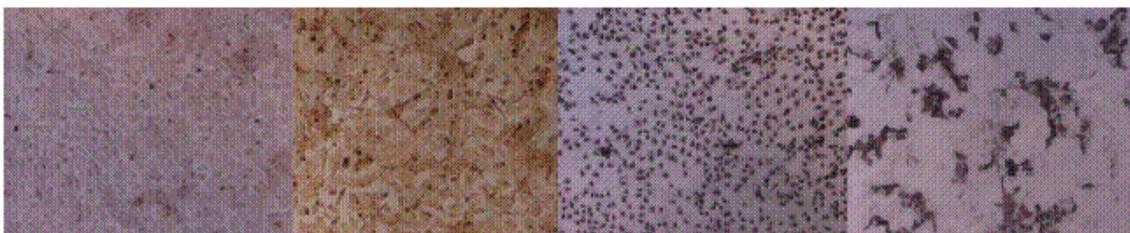
Parece que el aumento de muerte celular que se producen en las células que crecen en oxígeno 100% (Tabla 5, 12 y 13) (Fig 7) se debe a un incremento de la muerte celular programada de los neumocitos tipo II in Vitro^{221, 222, 223}. El nivel de apoptosis que sufren los cultivos celulares es dependiente y proporcional al tiempo de exposición. A las 24 y 48 horas el nivel de apoptosis es detectable pero no significativo ya que no consigue alterar la densidad celular del cultivo. Hecho que sí tiene lugar a partir de las 48 y hasta las 96 horas (Tabla 7, 16-18) (Fig 9 y 10). Se podría decir que a las 24 y 48 horas las células son capaces de mantener el balance entre el porcentaje de muerte celular y la capacidad proliferativa²¹⁵. Se ha demostrado que altas concentraciones de oxígeno produce la detención de la fase-S del ciclo celular y un aumento en la expresión de los genes p53 y p21. La activación de estos genes podría inhibir la replicación celular sin inducir un grado de apoptosis importante²²⁴ y a partir de las 48 horas el equilibrio entre la capacidad proliferativa y

el porcentaje de muerte celular desaparece^{217, 218, 219, 220}. No obstante y a pesar de los estudios que aún son necesarios realizar, parece que la apoptosis generada por el fenómeno de la hiperoxia se podría ver reducida por una incorporación extra al organismo de determinados sistemas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa (SOD) y/o por la eliminación de TNFalfa y su receptor TNFR1 ya que dichos factores permiten la activación de la apoptosis por medio de las caspasas 8 y 3^{225, 226}.

Figura 9. Secuencia de imágenes al microscopio óptico (X10) de neumocitos tipo II crecidos en oxígeno 21% mostrando el nivel de apoptosis a las 24, 48, 72 y 96 horas.



Figura 10. Secuencia de imágenes al microscopio óptico (X10) de neumocitos tipo II tratados con oxígeno puro mostrando el nivel de apoptosis a las 24, 48, 72 y 96 horas.



2. Sobre la agresión del oxígeno “In Vivo”

2.1. Sobre la agresión del oxígeno en ratas

Para tratar de conocer con mayor precisión los factores que modulan en mayor o menor grado la toxicidad del oxígeno tanto en el buceo profesional como en las personas sometidas a oxigenoterapia hiperbárica (OHB) hemos realizado una serie de experimentos en ratas.

Se partió de unos niveles de presión parcial de oxígeno normobárico cercanos al 100% y se pretendía objetivar la supervivencia de animales de experimentación estableciendo controles sobre aquellos factores no determinantes, por un lado los invariables como la edad, sexo y factores individuales y por otro los variables como el estrés, la dieta, la temperatura ambiental y la humedad relativa. Se ha establecido que la edad influye en la toxicidad por oxígeno²²⁷, pero no ha sido hasta el año 2002 en el que se ha profundizado en los límites de edad y las causas de éstas diferencias, según Gomi, las ratas de más edad son menos tolerantes al oxígeno ya que presentan unos niveles de daño oxidativo más elevados que las ratas de menor edad. Este fenómeno se debe a que la eficacia en la actividad de los enzimas oxidantes de las ratas ancianas es menor²²⁸. Aunque según el trabajo de Servais, en condiciones de elevadas concentraciones de oxígeno aumenta tanto la superóxido dismutasa (SOD) como la glutatión peroxidasa (GPx) en ratas adultas pero dicho incremento no es lo suficientemente significativo como para poder igualar la actuación de los sistemas antioxidantes de las ratas más jóvenes²²⁹. Sin embargo, parece que asegurar la supervivencia en ratas fetales frente a la hiperoxia es más importante ya que en este estadio parece existir potentes mecanismos antioxidantes en los neumocitos tipo II de dichas ratas que mejoran su supervivencia y que las hace más tolerantes a la

toxicidad del oxígeno que las adultas²³⁰. Además de los potentes mecanismos antioxidantes, las ratas neonatas presentan una respuesta inflamatoria pulmonar frente a la hiperoxia más baja que la de ratas adultas. Este hecho parece deberse a las diferencias que existen en la expresión del gen de la L-selectina que podría contribuir, en parte, al aumento de la tolerancia a la toxicidad por oxígeno en ratas recién nacidas²³¹. Todos los animales con los que se experimentó fueron de la misma edad, entre 7 y 8 semanas. De esta forma se intentó que no afectase el factor de la edad en nuestro experimento.

Se ha demostrado que tras diversos tratamientos recompresivos a accidentados de buceo las mujeres son 2.8 veces más susceptibles de presentar toxicidad por oxígeno que los hombres poniéndose de manifiesto la influencia del sexo en la toxicidad por oxígeno⁹⁴. Los diversos autores consultados no expresan éstas diferencias en el reino animal.

Existen distintas respuestas individuales o interindividuales a presiones de oxígeno y tiempo de exposición similares, en íntima relación con la capacidad individual de activar mecanismos antioxidantes¹¹. Este hecho estaría íntimamente relacionado con la edad del individuo como ya se ha demostrado anteriormente ya que la rapidez y la eficacia con la que se activan los mecanismos antioxidantes son mayores cuanto más joven se es.

Otro factor que puede influir en el riesgo de sufrir toxicidad por oxígeno son los gases inertes. Se ha demostrado que un aumento en las presiones parciales de nitrógeno supone una disminución de la tolerancia al oxígeno. De modo que se

podría tomar de referencia la sensibilidad de sufrir una narcosis como indicativo para poder evitar la toxicidad por oxígeno²³². Pero la investigación ha dado un paso adelante y se ha centrado en buceadores que respiran mezclas de oxígeno enriquecidas con nitrógeno (NITROX) centrándose en la óxido nítrico sintasa, enzima productora del óxido nítrico del organismo. Tras numerosas investigaciones se ha comprobado que ciertos inhibidores de dicha enzima aumentan el periodo de latencia previa a la intoxicación por oxígeno²³³.

El estrés juega un papel fundamental porque las situaciones de pánico y de ejercicio físico favorecen la aparición de la toxicidad cerebral directa y pulmonar indirecta. Eynan sugiere que una exposición prolongada a hiperoxia induce una reducción en la eficacia energética²³⁴. Por este motivo y para evitar en lo posible el estrés o para minimizarlo, los animales se mantuvieron en situación de reposo y en el lugar del experimento de forma previa a su inicio.

Todos los animales ingirieron el mismo tipo de dieta y con la misma composición que la utilizada en el criadero de animales de la Universidad de Murcia antes de nuestro experimento. Aunque esta dieta contiene vitamina E y C, que como antioxidantes previenen la toxicidad por oxígeno, sin embargo no contiene determinadas sustancias como las antocianinas presentes en verduras que inhiben las enzimas proteolíticas que a su vez degradan el colágeno y elementos de la matriz extracelular²³⁵. En el 5.5% de minerales que contiene la dieta se encuentra el selenio, elemento importante en la intoxicación por oxígeno ya que se ha demostrado que un suplemento con este elemento supone un beneficio contra los efectos de la hiperoxia²³⁶.

Algunos autores establecen una temperatura entre 20 y 25°C como la ideal para obtener la máxima tolerancia al gas⁸⁶ y otros consideran que la aclimatación al calor retrasa la toxicidad⁴⁸. Lo cierto es que la hiperoxia no afecta a las respuestas de sudoración pero sí puede suponer un factor inhibitorio en la termorregulación del flujo sanguíneo de la piel²³⁷.

Por todo ello, se optó por mantener una temperatura constante entre 20 y 25°C.

Desde antiguo la humedad ha tenido cierta importancia en la toxicidad por oxígeno ya que la bibliografía habla de que la magnitud de la pérdida de calor que se produce en el tracto respiratorio durante el ejercicio, importante en la patología del asma, está relacionada inversamente con el contenido de agua del gas inspirado²³⁸.

La humedad ambiental a nivel cerebral no presenta influencia mientras que a nivel pulmonar sí existe pero no está bien determinada⁴⁸, estos datos son confirmados por otros estudios que añaden que las exposiciones a baja humedad están asociadas con un engrosamiento epitelial importante⁴⁹, sin embargo otras publicaciones establecen que una humedad relativa del 62% presenta mayor tolerancia a la intoxicación por oxígeno bajo condiciones normobáricas que una humedad cercana al 30%⁵⁰.

Sin embargo nuestros experimentos indican que los animales que respiraron oxígeno seco en condiciones normobáricas tienen una mayor probabilidad de sobrevivir que los que respiran oxígeno húmedo ($p < 0.001$).

En relación con los hallazgos anatomopatológicos se observó que las lesiones intersticiales, típicas en este tipo de alteraciones⁹ solo aparecen en los animales de más supervivencia luego están relacionados con la edad y en el grupo control (que

son los que más supervivencia presentan). Sí aparecen edemas intraalveolares, lesiones por otro lado frecuentes en este tipo de afectaciones (Tabla 20).

Nuestros resultados coinciden con los experimentos hiperbáricos de otros autores que observan un mayor daño pulmonar en ratas que respiran gas húmedo, asumiendo que un bajo nivel de humedad actúa como factor de protección frente a la intoxicación por oxígeno⁵⁰. La clínica que presentan los animales es la típica de la intoxicación por oxígeno hiperbárico. La única diferencia es que aparece más tarde. Numerosos autores nos avalan con sus hipótesis^{50, 235, 239, 240, 241} ya que el gas húmedo en condiciones normobáricas es más accesible al sistema circulatorio como resultado de diferencias en la difusión de las membranas alveolares o a otros cambios en la dinámica de perfusión considerando además una posible adaptación del sistema respiratorio al ambiente hiperóxico.

Los resultados obtenidos demuestran que humedades relativas comprendidas entre 30%-60% son las óptimas para disminuir el riesgo de presentar un cuadro de intoxicación por oxígeno bajo condiciones de hiperoxia normobárica.

2.2. Sobre la agresión del oxígeno en buceadores

Algunos de los parámetros sanguíneos estudiados en el hemograma de buceadores profesionales sufren variaciones importantes con la exposición a hiperoxia. Según la bibliografía con las modificaciones en la presión parcial de oxígeno tienen lugar alteraciones en la concentración de la eritropoyetina y en la actividad eritropoyética. Se encontró variación en el volumen corpuscular medio (VCM) y además lo hace paralelamente a la frecuencia de exposición a hiperoxia, es decir, a mayor frecuencia de exposición mayor es el VCM. Lo mismo ocurre en estudios de la microcirculación cerebral de rata, en donde situaciones de hiperoxia

produce un aumento en la cantidad de hemoglobina y con ella un incremento del VCM²⁴².

También se ha visto que en determinadas intoxicaciones distintas a las ocasionadas por el oxígeno, dicho parámetro también aumenta²⁴³. Este mismo fenómeno podría estar ocurriendo en los buceadores en los estadios más tempranos de la intoxicación por oxígeno.

Al producirse alteraciones en el VCM cabe esperar con una alta probabilidad, modificaciones en el índice corpuscular eritrocitario (RDW) de los buceadores ya que este otro parámetro mide el rango de dispersión del VCM. Según aumenta la exposición a oxígeno puro, el RDW sufre también un incremento simultáneo y lineal, es decir, cuanto mayor es la exposición a hiperoxia más alta es la dispersión o diferencias en el tamaño de los eritrocitos entre sí. Por lo que se demuestra que la exposición que sufren los buceadores en el programa de entrenamiento ocasiona alteraciones no uniformes en el volumen de los hematíes²⁴⁴. Podemos decir que las altas concentraciones de oxígeno producen alteraciones de importancia en el número de plaquetas, en el volumen plaquetario medio (VPM) y en el plaquetocrito. Por lo que se modifica tanto el número, el volumen como el porcentaje plaquetario en sangre. El comportamiento de los tres parámetros responde a una campana de Gauss aumentando cuando lo hace la exposición al oxígeno puro y disminuyendo cuando dicha exposición también lo hace. La explicación al aumento que experimentan podría ser la aparición de cierto grado de inflamación que tiene lugar durante las primeras fases del daño pulmonar por intoxicación de oxígeno y el descenso que se produce después coincide con una fase más tardía de la intoxicación, en la que se produce una reducción de los parámetros plaquetarios quizá por la poca eficacia que

presenta el pulmón de retener y fragmentar los megacariocitos para liberar plaquetas²⁴⁵.

Tanto el porcentaje como del valor absoluto de linfocitos aumentan y es que está demostrado que exposiciones prolongadas a hiperoxia normobárica están asociadas con una activación de la migración y secuestro de linfocitos por el pulmón²⁴⁶.

Otros parámetros que encontramos que incrementan su valor de forma significativa son el porcentaje y valor absoluto de neutrófilos. La exposición a hiperoxia ocasiona acumulación de neutrófilos y aparición de edema en el pulmón expuesto. Son estos neutrófilos los que producirían un daño oxidativo y desencadenarían la respuesta inflamatoria en el pulmón de continuar la exposición²⁴⁷.²⁴⁸ Una vez que cesa la exposición a oxígeno puro los niveles de linfocitos, los de neutrófilos, el volumen corpuscular medio, el recuento de plaquetas, el volumen plaquetario medio y el plaquetocrito regresan a sus valores normales, por lo que podríamos estar ante un fenómeno de adaptación de algunos parámetros hematológicos de manera que intentarían así amortiguar las consecuencias tóxicas de una exposición de este tipo.

La capacidad antioxidante total del plasma en humanos es parte de un mecanismo homeostático finamente regulado. Este mecanismo actúa como un eficiente sistema antioxidante importante en el control del daño oxidativo causado por la hiperoxia que puede verse alterado por determinados factores²⁴⁹, uno de ellos es la disminución en el plasma del ácido ascórbico²⁵⁰.

El estado antioxidante total (TAS) plasmático basal en buceadores que respiran oxígeno puro en equipos de circuito cerrado es normal y similar a otros estudios en atletas^{251, 252}. Se observó un descenso significativo en la concentración

del TAS plasmático entre la primera y la sexta semana del programa de entrenamiento, pero dicha concentración en la décimo segunda semana fue muy similar a la de la primera semana (Tablas 51 y 62). Se sugiere que la hiperoxia que generan los equipos de circuito cerrado en los buceadores puede comprometer el mecanismo de defensa antioxidante al principio del programa de entrenamiento, lo cual puede ser resuelto por un proceso adaptativo a la exposición a hiperoxia. La adaptación a la hiperoxia, según la bibliografía puede ocurrir dependiendo de la duración de la exposición y de los tipos de lesiones que se produzcan en el pulmón. Durante dicha exposición se ha observado que se producen modificaciones a nivel de la secreción del líquido surfactante junto con un aumento progresivo del contenido en fosfolípidos del ácido araquidónico alveolar. Pero a pesar de estas alteraciones la composición y síntesis del líquido surfactante tiende a recuperarse²⁵³. Además, en el proceso de adaptación a la hiperoxia se produce una fuerte estabilización de las membranas en el corazón, cerebro e hígado. Dicha adaptación suele aparecer 15 días después de la exposición²⁵⁴. Esto es lo que puede estar pasando en los buceadores de combate.

Los buceadores entrenados con equipos de oxígeno de circuito cerrado sufren toxicidad por oxígeno mostrando síntomas a las pocas inmersiones, hecho que desaparece con las sucesivas inmersiones²⁵⁵. De esta forma, al final del programa sus niveles de TAS plasmático están prácticamente recobrados²⁵⁶ (Tabla 51 y 62).

La Glutacion peroxidasa (GPx) juega un importante papel en el mecanismo enzimático endógeno y protector reduciendo los efectos perjudiciales de la oxidación en las células²⁵⁷, concretamente es el glutacion intracelular el responsable de estimular la tolerancia o protección de las células epiteliales pulmonares frente al daño oxidativo²⁵⁸.

Aunque los niveles de glutathion peroxidasa tienden a aumentar en la adaptación a una exposición continua al oxígeno hiperbárico en numerosos animales^{259, 260}, en humanos se apreció un descenso significativo en la concentración en la GPx al final del estudio (Tabla 51 y 63), similar a la encontrada por otros autores²⁶¹. Este descenso en la GPx durante exposiciones intermitentes a elevadas concentraciones de oxígeno, podría estar relacionado con una reducción del daño oxidativo debido a la aclimatación a la hiperoxia siendo necesarios niveles más bajos de GPx. En los últimos años se ha demostrado que la glutathion-S-transferasa del hígado desempeña un importante papel en la eliminación de los productos de la peroxidación lipídica acumulados durante una exposición hiperóxica²⁶².

Los isoprostanos urinarios son unos importantes indicadores de la peroxidación lipídica y ésta a su vez se relaciona con severas lesiones ocasionadas por el daño oxidativo²⁶³.

Se observó una disminución en los isoprostanos urinarios (Tabla 51 y 64) pero con el tiempo de exposición se estabilizan. Estos datos están de acuerdo con estudios previos^{264, 265}, sugiriendo que la peroxidación lipídica producida en buceadores que respiraron oxígeno puro con equipos de circuito cerrado, no es importante tal vez porque tendría lugar un proceso adaptativo a las condiciones hiperóxicas descartando así la aparición de severas lesiones pulmonares en los buceadores.

Se apreciaron unos niveles basales de NO ($49.61 \pm 19.86 \mu\text{M}$) (Tablas 51 y 61) que coincidieron con otros trabajos²⁶⁶ en jugadores de fútbol ($58.03 \pm 15.20 \mu\text{M}$). Según estudios previos^{267, 268}, una exposición hiperóxica de 30 minutos, frecuentemente desarrollada por buceadores no profesionales, podría inducir un daño oxidativo que cursaría con inflamación de las vías respiratorias. Además, en

buceadores que respiraron oxígeno 100% con equipos de circuito cerrado, tiene lugar un comprobado incremento de ROS (O^{2-}), debido a la exposición a condiciones hiperóxicas.

Existe una fuerte tendencia a creer que el NO aumenta con la hiperoxia^{172, 269}, produciendo anormalidades en la estructura pulmonar, disminución en el crecimiento vascular y lesiones en la alveolización²⁷⁰.

Nuestras observaciones ponen de manifiesto una disminución inicial a las 6 semanas en la concentración de NO, pero según transcurre el tiempo de exposición los niveles de NO tienden a estabilizarse y por último a disminuir significativamente en la semana 12, lo cual no excluye que en los primeros 30 minutos no se pudiera haber producido un incremento de los niveles de óxido nítrico encontrado por otros autores. Este hecho podría estar relacionado con un descenso en la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) durante el programa de entrenamiento. Existen evidencias directas de que la hiperoxia reduce la liberación basal de NO en arterias coronarias de porcinos precisamente por este mismo hecho²⁷¹. Tampoco se aprecia un aumento del NO exhalado a pesar de apreciarse una inducción de la expresión de la iNOS pulmonar en estudios en animales de experimentación²⁷².

Sin embargo cada vez más autores piensan que el aumento de las sustancias reactivas de oxígeno que tiene lugar cuando se respiran concentraciones elevadas de oxígeno tales como el anión superóxido (O^{2-}) reaccionen con el NO formando peroxinitritos ($ONOO^-$) que son potencialmente más tóxicos²⁷³. Es precisamente esto lo que cree Nelin²⁷⁴. Se ha demostrado que en terapias de vasodilatación pulmonar de inhalación de NO se produce el fenómeno anterior de combinación de O^{2-} con el NO aumentando considerablemente los $ONOO^-$. Esto es lo que podría estar pasando en el

sistema pulmonar de nuestros buceadores sólo que el incremento de NO no lo produce la inhalación de éste, sino las condiciones hiperóxicas. Tengamos en cuenta que este proceso ya ha sido comprobado en el sistema nervioso de ratas recién nacidas bajo condiciones hiperóxicas²⁷⁵.

Según la bibliografía, en ocasiones el aumento inducido por elevadas concentraciones de oxígeno de los ONOO⁻ iría acompañado de la activación de una cascada de respuestas que terminaría en última instancia en una muerte celular programada y en alteraciones en los componentes del líquido surfactante^{223, 273}.

La óxido nítrico sintasa (NOS) parece cobrar cada vez más importancia en esta área ya que en un estudio reciente propone que dicho enzima media en la cardioprotección del sistema coronario dependiendo directamente de la disponibilidad de oxígeno²⁷⁶. El papel protector del NO se traslada también al sistema respiratorio en ratas neonatas. La inhalación de NO mejora la patología pulmonar además de prolongar la supervivencia por una reducción del grosor del septum, inhibición de la inflamación y disminución de los depósitos de fibrina alveolar²⁷⁷. Este efecto protector del NO parece estar asociado a un aumento en la capacidad antioxidante que experimenta la célula bajo condiciones hiperóxicas²⁷⁸.



CONCLUSIONES

VI CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN 1ª

La hiperoxia produce un aumento de determinados sistemas antioxidantes como la catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y NADH deshidrogenada que permiten mantener el balance entre el porcentaje de muerte celular y la capacidad proliferativa desde las 24 hasta las 48 horas de exposición.

CONCLUSIÓN 2ª

A partir de 48 horas de exposición de los neumocitos tipo II a un ambiente hiperoxico los sistemas antioxidantes de la célula no son capaces de neutralizar y eliminar el considerable aumento en la concentración de especies libres de oxígeno (ROS) que se ha generado y por ello se produce un descenso importante en la viabilidad y crecimiento de los neumocitos tipo II.

CONCLUSIÓN 3ª

El cultivo de los neumocitos tipo II en hiperoxia por más de 48 horas desencadena un aumento de la muerte celular programada de los neumocitos que ya no puede ser compensada por la capacidad antioxidante celular debido a un aumento muy importante en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

CONCLUSIÓN 4ª

La humedad modifica la toxicidad del oxígeno respirado en condiciones normobáricas, de tal manera que humedades relativas comprendidas entre el 30% y el 60% son las óptimas para disminuir el riesgo de presentar un cuadro de

intoxicación pro oxígeno in vivo, bajo condiciones de hiperoxia normobárica. Humedades por encima del 60% son perjudiciales y produce mayor daño que humedades por debajo del 30% o con oxígeno seco.

CONCLUSIÓN 5ª

La hiperoxia produce tanto un aumento del número de plaquetas, del volumen plaquetario medio como del plaquetocrito y disminuye cuando la exposición cesa o disminuye.

CONCLUSIÓN 6ª

La hiperoxia produce un aumento en el volumen corpuscular medio (VCM), en el índice de dispersión eritrocitaria (RDW).

CONCLUSIÓN 7ª

La exposición a hiperoxia produce tanto un aumento en el porcentaje de linfocitos como en su valor absoluto que disminuyen cuando la exposición cesa.

CONCLUSIÓN 8ª

La hiperoxia produce tanto un aumento en el porcentaje de neutrófilos como en su valor absoluto que disminuye cuando la exposición cesa.

CONCLUSIÓN 9ª

La capacidad antioxidante plasmática (TAS) al principio disminuye aproximadamente durante las 6 primeras semanas de entrenamiento pero a las 12

semanas se recupera la capacidad antioxidante inicial debido a un proceso adaptativo.

CONCLUSIÓN 10ª

La utilización de equipos de inmersión con oxígeno en circuito cerrado no llega a producir alteraciones peroxidativas severas en los buceadores ya que los isoprostanos urinarios disminuyen durante el periodo de entrenamiento, debido a los procesos adaptativos que se reflejan en el mantenimiento de la capacidad antioxidante total del plasma ya descrito.

CONCLUSIÓN 11ª

Los cambios en los niveles plasmáticos de óxido nítrico que podrían indicar un efecto positivo no son claros ya que su disminución puede ser consecuencia de diferentes procesos como la transformación en peroxinitritos, radical muy agresivo o por la disminución en la actividad de la óxido nítrico sintasa que daría el mismo resultado pero en este caso el resultado sería positivo, menor nivel de agresión.



BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Frank L, Massaro D. Oxygen toxicity. *Am J Med* 1980;69:117-126.
2. Gilbert D.L. Significance of oxygen on earth. En: *Oxygen and living process*. Gilbert DL ed. New York: Springer-Verlag; 1981:73-101.
3. Hart M.H. Habitable zones about main sequence stars. *Icarus* 1979;37:351-357.
4. Walker J.C.G. *Evolution of the atmosphere*. New York: MacMillan; 1977.
5. Herbig G.H. The origin and astronomical history of terrestrial oxygen. En: *Oxygen and living process*. Gilbert DL ed. New York: Springer-Verlag; 1981:64-71.
6. Weisz P.B. *La ciencia de la Biología*. Barcelona: Omega SA; 1982:153-155.
7. Stryer L. *Bioquímica (I) (3ª ed)*. Barcelona: Reverté; 1990.
8. Schatz A. Some biochemical and biological considerations regarding the extinction of the dinosaurs. *Proc Penn Acad Sci* 1957;31:26-36.
9. Lowry C. Oxygen toxicity. En: Edmonds C, Lowry C, Pennefather J, Walter R (ed 4ª). *Diving and Subaquatic Medicine*. Great Britain: Oxford University Press, 2002;207-222.
10. Acott C. Oxygen toxicity: a brief history of oxygen in diving. *South Pacific Underwater Medicine Society Journal* 1999;29:150-155.
11. Donald K.W. *Oxygen and the diver*. Harley Swan 1992, Worcestershire, UK: The Spa Ltd.

12. Bert P. La pression barometrique: Recherches de Physiologie Experimentale. Translated by M.A. Hitchcock and F.A. Hitchcock, published as Barometric Pressure: Researches in experimental physiology, 1943. Columbus, OH: College book company. Reprinted 1978 by Undersea Medical Society, Bethesda, MD.
13. Donald K.W. Oxygen poisoning in man. I, II. British Medical Journal 1947;1:667-672,712-717.
14. Gallar, F. Medicina subacuática e hiperbárica. Compilador. Madrid: Instituto Social de la Marina. 3ª edic. 1995.
15. David E. Exploring Under the Sea. The Science Museum. H. M. Stationary Office. London, 1977.
16. Davis R.H. Deep Diving and Submarine Operations. Siebe Gorman and Co., Ltd. London, 1995.
17. Degimbe J. Technical and Human Aspects of Diving and diving Safety. EDTC. Brussels, Luxemburgo, 1981.
18. Goodfellow R. Underwater Engineering. Petroleum Publishing Company. Tulsa, Oklahoma, 1977.
19. Koblink I.G. Living and Working in the Sea. Library of Congress. USA, 1984
20. Straus R.H. Diving Medicine. Library of Congress. USA, 1976.
21. Talkington H.R. Undersea Work Systems. Library of Congress. USA, 1981.
22. Zinkowsky N.B. Commercial Oil Field Diving. Cornell Maritime Press. Inc., USA, 1978.
23. Ivars P.J, Rodríguez C.T. Historia del buceo su desarrollo en España. Ediciones Mediterráneo. Barcelona. 1987.

24. Lucas M.C. Lesiones pulmonares y modificaciones bioquímicas del surfactante pulmonar inducidas por oxígeno a altas concentraciones. Estudio experimental. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 1993.
25. Adivp-2 Allied Guide to diving medical disorders. Nato Unclassified Publication. 2000.
26. Olea A. Modificaciones espirométricas observadas durante los cursos de buceo con aire comprimido realizados en el centro de buceo de la armada. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 2005.
27. Clark J.M. The predictive studies series: Correlation of physiologic responses to extreme environmental stresses. *Undersea Hyperb Med* 2004;31(1):33-51.
28. Alcaraz-García M.J. Aspectos tóxicos del oxígeno. En Olea A, Alcaraz-García MJ, Sánchez Gascón F (ed 1ª). *Medicina Subacuática e Hiperbárica*. España: Aulas del Mar. Universidad de Murcia. 2004:73-80.
29. Crosbie W.A, Cumming G, Thomas LR. Acute oxygen toxicity in a saturation diver working in the North Sea. *Undersea Biomed Res* 1982;30:231-235.
30. Thorsen E, Segadal K, Myrseth E, Pasche A, Gulsvi K. Pulmonary mechanical function and diffusion capacity after deep saturation dives. *Br J Ind Med* 1990;47:242-247.
31. Crapo J.D. Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Annu Rev Physiol*. 1986;48:721-731.
32. Alcaraz-García MJ. Afectación pulmonar por oxígeno. En Olea A, Alcaraz-García MJ, Sánchez Gascón F (ed 3ª). *Medicina Subacuática e Hiperbárica*. España: Aulas del Mar. Universidad de Murcia, 2006:31-36.

33. Perkowski S, Sun J, Singhal S, Santiago J, Leikauf GD, Albelda SM. Gene expression profiling of the early pulmonary response to hyperoxia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28:682–696.
34. Crapo J.D, Barry BE, Foscue HA, Shelburne J. Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *Am Rev Respir Dis.* 1980;122:123–143.
35. May M, Strobel P, Preissshofen T, Seidenspinner S, Marx A, Speer CP. Apoptosis and proliferation in lungs of ventilated and oxygen-treated preterm infants. *Eur Respir J.* 2004;23:113–121.
36. Tudor R.M, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, Voelkel NF, Flores SC. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29:88–97.
37. Matute-Bello G, Winn RK, Jonas M, Chi EY, Martin TR, Liles WC. Fas (CD95) induces alveolar epithelial cell apoptosis in vivo: implications for acute pulmonary inflammation. *Am J Pathol.* 2001;158:153–161.
38. Janssen Y.M, Matalon S, Mossman BT. Differential induction of c-fos, c-jun, and apoptosis in lung epithelial cells exposed to ROS or RNS. *Am J Physiol.* 1997;273:L789–L796.
39. Lukkarinen H.P, Laine J, Kaapa PO. Lung epithelial cells undergo apoptosis in neonatal respiratory distress syndrome. *Pediatr Res.* 2003;53:254–259.
40. O'Reilly M.A, Staversky RJ, Stripp BR, Finkelstein JN. Exposure to hyperoxia induces p53 expression in mouse lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;18:43–50.

41. Pagano A, Barazzone-Argiroffo C. Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1010:405-416.
42. Gerik S.M, Keeney S.E, Dallas D.V, Palkowetz K.H, Schmalstieg F.C. Neutrophil adhesion molecule expression in the developing neonatal rat exposed to hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29:506-512.
43. Luo X.P, Liao L.J, Li Y.X, Liu Y, Liu W.J, Tanswell A.K, Ning O. Effects of U74389G on pulmonary macrophage influx and lung development in 95% O₂ exposed newborn rats. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2004;42:134-138.
44. Thompson L.R, Keeney S.E, Tarrant D, Rudloff E, Dallas D.V, Schmalstieg F.C. Lipopolysaccharide protection from oxygen toxicity: effects on rat pulmonary selectins. *Inflammation.* 2004;28:147-157.
45. Louzier V, Raoul W, Leroux A, Branellec D, Caillaud J.M, Many H, Levame M, Delclaux C, Adnot S, Maitre B. Adenovirus-mediated fibroblast growth factor 1 expression in the lung induces epithelial cell proliferation: consequences to hyperoxic lung injury in rats. *Hum Gene Ther.* 2004;15:793-804.
46. Cederqvist K, Janer J, Tervahartiala T, Sorsa T, Haglund C, Salmenkivi K, Stenman U.H, Andersson S. Up-regulation of trypsin and mesenchymal MMP-8 during development of hyperoxic lung injury in the rat. *Pediatr Res.* 2006;60:395-400.
47. Torbati D, Tan G.H, Smith S, Frazier K.S, Gelvez J, Fakioglu H, Totapally B.R. Multiple-organ effect of normobaric hyperoxia in neonatal rats. *J Crit Care.* 2006;21:85-93.
48. Arieli R, Moskovitz Y. Humidity does not affect central nervous system oxygen toxicity. *J Appl Physiol.* 2001;91:1327-1333.

49. Murchie P, Johnston PW, Ross JA, Godden DJ. Effects of hyperoxia on bronchial wall dimensions and lung mechanics in rats. *Acta Physiol Scand.* 1993;148:363-370.
50. Lin Y, Jamieson D. Effect of humidity on hyperoxic toxicity. *J Appl Physiol.* 1993;75:1980-1983.
51. Shupak A, Abramovich A, Adir Y, Goldenberg I, Ramon Y, Halpern P, Ariel A. Effects on pulmonary function of daily exposure to dry or humidified hyperbaric oxygen. *Respir Physiol* 1997;108:241-246.
52. Singer M.M, Wriqth F, Stanley L.K, Rob B.B, Hamilton W.K. Oxygen toxicity in man: A prospective study in patients after open-heart surgery. *New Engl J Med.* 1970;283:1473-1478.
53. Barthelemy L. Toxicité pulmonaire de l'oxygène. Exposé introductif de la réunion de physiologie respiratoire. Association des phisiologites de langue française. Marsella: IRMS. 1982.
54. Widell P.J, Bennett P.B, Kivlin P, Gray W. Pulmonary oxygen toxicity in man at 2 ATA with intermittent air breathing. *Aerospace Med.* 1974;45(4):407-410.
55. Melietjl L. Hyperoxie. *Medsubhyp.* 1989;8(1):23-26.
56. Gardette B. Correlation between decompression sickness and circulating bubbles in 232 divers. *Undersea Biomed Res.* 1979;6:99-107.
57. Winsborough M.M, McKenzie R.S. Pulmonary oxygen toxicity and the preedematosus lung. *Médecine aéronautique et spatiales, médecine subaquatique et hyperbare.* 1997;16:254-256.

58. Clark J.M, Jackson R.M., Lambersten C.J, Gelfand R, Hillerw D.B, Unger M.
Pulmonary function in a men after oxygen breathing at 3.0 ATA for 3.5 h. *J Appl Physiol.* 1991;71:878-885.
59. Huber G.L, Drath D.B. Pulmonary oxygen toxicity. En: Gilbert DL ed.
Oxygen and living process. New York. Springler-Verlag; 1981:273-342.
60. Brueckl C, Kaestle S, Kerem A, Habazetti H, Krombach F, Kuppe H,
Kuebler W.M. Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in
pulmonary capillary endothelial cells in situ. *Am J Respir Cell Mol Biol.*
2006;34:453-463.
61. Clark J.M, Lambersten C.J. Pulmonary oxygen toxicity. A review.
Pharmacolo Rev. 1971;23:38-133.
62. Clark J.M. Extension of oxygen tolerance by interrupted exposure. *Undersea
Hyperb Med.* 2004;31:195-198.
63. Bitterman N. CNS oxygen toxicity. *Undersea Hyperb Med.* 2004;31:63-72.
64. Deneke S.M, Fanburg B.L. Oxygen toxicity of the lung: an update. *Br J
Anaesth.* 1982;54:737-745.
65. Edmonds C, Lowry C, Pennefather J. Inert gas Narcosis. En: Edmonds C.
Lowry C. Pennefather J. (eds.). *Diving and Subaquatic Medicine.* 3rd eds.
Oxford. Butterworth-Heinemann. 1992:215-225.
66. Hamilton R.W. Toleting exposure to high oxygen levels. Repex and others
methods. *Mar Tech Soc J.* 1989;23:19-25.
67. Hendricks P.L, Hall D.A, Hunter W.L., Haley P.J. Extension of pulmonary
oxygen tolerance in man at 2 ATA by intermittent oxygen exposure. *J Appl
Physiol.* 1977;42:593-599.

-
68. Griffith D.E, Garcia J.G, James H.L, Callahan K.S, Iriana S, Holiday D. Hyperoxic exposure in humans. Effects of 50% oxygen on alveolar macrophage leukotriene B4 synthesis. *Chest*. 1992;101:392-397.
69. Harabin A.L, Homer L.D, Weathersby P.K, Flynn E.T. An analysis of decrements in vital capacity as an index of pulmonary oxygen toxicity. *J Appl Physiol*. 1987;63:1130-1135.
70. Clark J.M, Lambersten C.J. Pulmonary oxygen tolerance and the rate of development of pulmonary oxygen toxicity in man at two atmospheres inspired oxygen tension. In: Lambersten C.J. Ed. *Underwater physiology*. Proc. 3rd sympos. *Underwater Physiol*. Baltimore. Williams-Wilkins, 1967:439-451.
71. Hyacinthe R, Giry P, Broussolle B. Évolution de la capacité vitale et de la capacité de diffusion chez huit sujets après plongée simulée á 450 m. *Medsubhyp*. 1981;20:77-79.
72. Lemaire C. Détermination du taux d'hyperoxie acceptable pour les plongées au long cours par la mesure de la capacité vitale. *Medsubhyp*. 1975;12:82-86
73. Gardette B, Lemaire C. Variations de la capacité vitale en fonction de la quantité d'oxygène inhalée au cours des décompressions. *Revue de Médecine Subaquatique et Hyperbare*. 1977;61:66-69.
74. Eckenhoff R.G, Dougherty J.H, Messier A.A, Osborne S.F, Parker J.W. Progression of and recovery from pulmonary oxygen toxicity in humans exposed to 5 ATA air. *Aviat Space Environ Med*. 1987;58:658-667.

75. Clark J.M, Lambersten C.J, Gelfand R, Flores N.D, Pisarello J.B, Rossman M.D, Elias J.A. Effects of prolonged oxygen exposure at 1.5, 2.0 or 2.5 ATA on pulmonary function in men (Predictive Studies). *J Appl Physiol.* 1999;86:243-259.
76. Adams G.M, Williamson R.A, Harvey C.H, Murray R.D, Hester R. Shallow habitat air diving with excursions between 5 and 250 fswg; a review of three simulated dives. In: *Underwater Physiology. Proceedings of the sixth symposium on Underwater Physiology.* Shilling CW. Beckett MW. (eds). Bethesda: FASEB. 1978:423-434.
77. Thorsen E, Anderud L, Aasen T.B. Effects of standard hyperbaric oxygen treatment protocol on pulmonary function. *Eur Respir J.* 1998;12:1442-1445
78. Mialion P, Barthelemy L, Michaud A, Lacour J.M. Pulmonary function in men after repeated sessions of oxygen breathing at 0.25 Mpa for 90 min. *Aviat Space Environ Med.* 2001;72:215-218.
79. Reed J.W, Elliott C, Thorsen E. Increased lung compliance in response to moderate hyperoxic exposure. *Undersea Hyper Med.* 2001;28:19-23.
80. Pott F, Westergaard P, Mortensen J, Jansen E.C. Hyperbaric oxygen treatment and pulmonary function. *Undersea Hyper Med.* 1999;26:225-228.
81. Suzuki S. Probable lung injury by long-term exposure to oxygen close to 50 kilopascals. *Undersea Hyper Med.* 1994;21:235-243.
82. Allen M.C, Watt S.J. Effect of hyperbaric and normobaric oxygen on pulmonary endothelial cell function. *Undersea Hyper Med.* 1993;20:39-48.
83. Nickerson P.A, Matalon S. Quantitative ultrastructural study of the rabbit lung: exposure to 60% oxygen for 21 days. *Undersea Biomed Res.* 1990;17:323-331.

84. Thorsen E, Segadal K, Kambestad B.K. Mechanisms of reduced pulmonary function after a saturation dive. *Eur Respir J*. 1994;7:4-10.
85. Deneke S.M, Fanburg B.L. Normobaric oxygen toxicity of the lung. *New Engl J Med*. 1980;303:76-86.
86. Lemaire C. Facteurs d'environnement de la plongée profonde. En : *Physiologie et plongée profonde. La recherche française en 1981. Direction des recherches, études et techniques. Rapports scientifiques et techniques, 48. Bretagne ; centre national pour les explotations des oceans*. 1981:9-18.
87. Calera A. Intoxicación por oxígeno, monóxido de carbono y dióxido de carbono. En. Instituto Social de la Marina (eds). Gallar F. *Medicina Subacuática e Hiperbárica*. 3ª edición. Ministerio de Trabajo y Seguridad Social 1995:271-282.
88. Kety S.S, Schmidt C.F. The effects of altered arterial tensions of carbon dioxide and oxygen on cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption of normal young men. *J Clin Invest*. 1948;27:484-492.
89. Reivich M. Regulation of the cerebral circulation. *Clin Neurosurg*. 1969;16:378-418.
90. Lambertsen C.J. Effects of hyperoxia on organs and their tissues. In: Robin ED, ed. *Extrapulmonary manifestations of respiratory disease*. Lenfant C, ed. *Lung biology in health and disease*. Vol 8. New York: Marcel Dekker; 1978:239-303.
91. Harabin A.L, Braisted J,C, Flynn E.T. Response of antioxidant enzymes to intermittent and continuous hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol*. 1990;69:328-335.

-
92. Kravetz G, Fisher A.B, Forman H.J. The oxygen-adapted rat model: tolerance to oxygen at 1.5 and 2 ATA. *Aviat Space Environ Med.* 1980;51:775-777.
93. Sheffield P.J. How the Davis 2.36 ATA wound healing enhancement treatment table was established. *Undersea Hyperb Med.* 2004;31:193-194.
94. Smerz R.W. Incidence of oxygen toxicity during the treatment of dysbarism. *Undersea Hyperb Med.* 2004;31:199-202.
95. Battestini R. Medio ambiente y pulmón. *Med Aerosp Amb.* 1996;6:295-298.
96. Hammond R.E, Akers T.K. Effects of adrenergic drug son pulmonary response to high-pressure oxygen. *Aerospace Med.* 1974;4:525-528.
97. Arieli R, Yalov A, Goldensluger A. Modeling pulmonary and CNS O₂ toxicity and estimation of parameters for humans. *J Appl Physiol.* 2002;92:248-256.
98. Arieli R. Model of CNS O₂ toxicity in complex dives with varied metabolic rates and inspired CO₂ levels. *Aviat Space Environ Med.* 2003;74:638-642.
99. Yarbrough I.D, Welham W, Brinton E.S, et al. Symptoms of oxygen poisoning and limits of tolerance at rest and at work. US Naval Experimental Diving Unit Proj X-337, Sub. No. 62, Report No. 1;1947.
100. Young J.M. Acute oxygen toxicity in working man. In: Lambersten CJ, ed. *Proceedings of the Fourth Symposium on Underwater Physiology.* New York: Academic Press; 1971:67-76.
101. Cohn R, Gersh I. Changes in brain potentials during convulsions induced by oxygen under pressure. *J Neurophysiol.* 1945;8:155-160.
102. Gibbs F.A, Davis H, Lennox W.G. The electroencephalogram in epilepsy and in conditions of impaired consciousness. *Arch Neurol Psychiatr.* 1935;34:1133-1148.

103. Lambertsen C.J, Clark J.M, Gelfand R. et al. Definition of tolerance to continuous hyperoxia in man: An abstract report of Predictive Studies V. In: Bove AA, Bachrach AJ, Greenbaum LJ, eds. Proceedings of the Ninth International Symposium on Underwater Hyperbaric Physiology. Bethesda, MD: Undersea and Hyperbaric Medical Society, 1987:717-735.
104. Torbati D, Simon A.J, Ranade A. Frequency analysis of EEG in rats during the preconvulsive period of O₂ poisoning. *Aviat Space Environ Med.* 1981;52:598-603.
105. Visser G.H, Van Hulst R.A, Wieneke G.H, et al. The contribution of conventional and quantitative electroencephalography during monitoring of exposure to hyperbaric oxygen. *Undersea Hyperb Med.* 1996;23:91-98.
106. Behnke A.R, Forbes H.S, Motley E.P. Circulatory and visual effects of oxygen at 3 atmospheres pressure. *Am J Physiol.* 1936;114:436-442.
107. Nichols C.W, Lambertsen C.J, Clark J.M. transient unilateral loss of vision associated with oxygen at high pressure. *Arch Ophthalmol.* 1969;81:548-552.
108. Zal'tsman G.L, Zinov'eva I.D, Kumanichkin S.D. Increased individual predisposition of a subject to the effect of high partial oxygen pressure. In: Brestkin MP, ed. The effect of the gas medium and pressure on body functions NASA TT F-358, TT 65-50136. Washington, DC: Israel Program for Scientific Translations; 1965:287-290.
109. Noell W.K. Metabolic injuries of the visual cell. *Am J Ophthalmol.* 1955;40:60-70.

-
110. Noell W.K. Effects of high and low oxygen tension on the visual system. In: Schaefer KE, ed. Environmental effects of consciousness. New York: Macmillan; 1962:3-18.
111. Bridges W.Z. Electroretinographic changes during hyperoxia. In: Brown IW Jr, Cox BG, eds. Proceedings of the Third International Conf Hyperb Med. Publication No. 1404. Washington, DC: Natl Acad Sci- Natl Res Council 1966a;263-269.
112. Bridges W.Z. Electroretinographic changes during hyperoxia. Arch Ophthalmol. 1966b;75:812-817.
113. Clark J.M. Pulmonary limits of oxygen tolerance in man. Exp Lung Res. 1988a;14:897-910.
114. Clark J.M, ed. Symposium on extension of oxygen tolerance. Exp Lung Res. 1988b;14:865-1058.
115. Butler F.K. Jr, White E, Twa M. Hyperoxia myopia in a closed-circuit mixed-gas scuba diver. Undersea Hyperb Med. 1999;26:41-45.
116. Anderson B. Jr, Farmer J.C. Jr. Hyperoxia myopia. Trans Am Ophthalmol Soc. 1978;76:116-124.
117. Anderson B. Jr, Sheldon D.L. Axial length in hyperoxic myopia. In: Bove A.A, Bachrach A.J, Greenbaum L.J, eds. Proceedings of the Ninth International Symposium on Underwater and Hyperbaric Physiology. Bethesda, M.D: Undersea and Hyperbaric Medical Society; 1987:607-611.
118. Lyne A.J. Ocular effects of hyperbaric oxygen. Trans Ophth Soc UK 1978;98:66-68.

119. Nichols C.W, Yanoff M, Hall D.A, et al. Histologic alterations produced in the eye by oxygen at high pressure. *Arch Ophthalmol.* 1972;87:417-421.
120. Halliwell B, Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine.* Clarendon Press, Oxford 1989.
121. Pryor W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetime, and reactions. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:657-667.
122. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1983;23:239-257.
123. Beckman J.S, Chen J, Ischiropoulos H, Crow J.P. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 1994;233:229-240.
124. Kinnula V.L, Crapo J.D, Raivio K.O. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest.* 1995;73:3-19.
125. Freeman B.A, Crapo J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982;47:412-426.
126. Sibille Y, Reynolds H.Y. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141:471-501.
127. Crystal R.G. Oxidants and respiratory tract epithelial injury: pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. *Am J Med.* 1991;91:39S-44S.
128. Kamp D.W, Graceffa P, Pryor W.A, Weitzman S.A. The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Radic Biol Med.* 1992;12:293-315.

129. Turrens J.F, Freeman B.A, Crapo J.D. Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 1982;217:411-421.
130. McCord J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985;312:159-163.
131. Linder N, Rapola J, Raivio K.O. Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Invest.* 1999;79:967-974.
132. Babior B.M. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest.* 1984;73:599-601.
133. Ruch W, Cooper P.H, Baggiolini M. Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horse-radish peroxidase. *J Immunol Methods.* 1983;63:347-357.
134. Kinnula V.L, Everitt J.I, Whorton A.R, Crapo J.D. Hydrogen peroxide production by alveolar type II cells, alveolar macrophages, and endothelial cells. *Am J Physiol.* 1991;261:L84-L91.
135. Kinnula V.L, Everitt L.I, Mangum J.B, Chang L.Y, Crapo J.D. Antioxidant defense mechanisms in cultured pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992c;7:95-103.
136. Freeman B.A, Crapo J.D. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem.* 1981;256:10986-10992.
137. Freeman B.A, Topolosky M.K, Crapo J.D. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lung homogenates. *Arch Biophys.* 1982;216:477-484.

138. Jamieson D, Chance E, Boveris A. The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:703-719.
139. Kinnula V.L, Chang L.Y, Ho Y.S, Crapo J.D. Hydrogen peroxide release from alveolar macrophages and alveolar type II cells during adaptation to hyperoxia in vivo. *Exp Lung Res.* 1992d;18:655-673.
140. Frank L. Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity. *Free Radic Bio Med.* 1991;11:463-494.
141. Schraufstatter I.U, Hinshaw D.B, Hyslop P.A, Spragg R.G, Cochrane C.G. Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest.* 1986;77:1312-1320.
142. Hyslop P.A, Hinshaw D.B, Halsey W.A, Jr, Schraufstatter I.U, Sauerhaber R.D, Spragg R.G, Jackson J.H, Cochrane C.G. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1988;263:1665-1675.
143. Davies K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem.* 1987;262:9895-9901.
144. Davies K.J, Delsignore M.E. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem.* 1987;262:9908-9913.
145. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:619-642.

146. Mignotte B, Vayssiere J.L. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem.* 1998;252:1-15.
147. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-2012.
148. Sen C.K, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 1996;10:709-720.
149. Burdon R.H. Control of cell proliferation by reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans.* 1996;24:1028-1032.
150. Bitterman N, Bitterman H. L- Arginine NO⁻ pathway and CNS oxygen toxicity. *J Appl Physiol.* 1998;84:1633-1638.
151. Chavko M, Braisted J.C, Outsa N.J, et al. Role of cerebral blood flow in seizures from hyperbaric oxygen exposure. *Brain Res.* 1998;791:75-82.
152. Oury T.D, Ho Y.S, Piantadosi C.A, et al. Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide and central nervous system O₂ toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:9715-9719.
153. Zhang J, Su Y, Oury T.D, et al. Cerebral amino acid, norepinephrine and nitric oxide metabolism in CNS oxygen toxicity. *Brain Res.* 1993;91:1110-1123.
154. Wang W.J, Ho X.P, Yan Y.L, et al. Intrasynaptosomal free calcium and nitric oxide metabolism in central nervous system oxygen toxicity. *Aviat Space Environ Med.* 1998;69:551-555.
155. Ito T, Yufu K, Mori A, et al. Oxidative stress alters arginine metabolism in rat brain: effect of sub-convulsive hyperbaric oxygen exposure. *Neurochem Int.* 1996;29:187-195.

156. Clague M.J, Wishnok J.S, Marletta M.A. Formation of N-cyanoornithine from NG-Hydroxy-L-arginine and hydrogen peroxide by neuronal nitric oxide synthase: implications for mechanism. *Biochemistry*. 1997;36:14465-14473.
157. Mittal C.K. Nitric oxide synthase: involvement of oxygen radicals in conversion of L-arginine to nitric oxide. *Biochem Biophys Res Comm*. 1993;193:126-132.
158. Hobbs A.J, Fukuto J.M, Ignarro L.J, et al. Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:10992-10996.
159. Ignarro L.J, Byrns R.E, Buga G.M, et al. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Cir Res*. 1987;61:866-879.
160. Demchenko I.T, Bosso A.E, O'Neill T.J, et al. Nitric oxide and cerebral blood flow responses to hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol*. 2000;88:1381-1389.
161. Forstermann U, Boissel J-P, Kleinert H. Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase. *FASEB J*. 1998;12:773-790.
162. Gath I, Ebert K, Godtel-Armbrust U, et al. NO synthase II in Mouse skeletal muscle is associated with caveolin 3. *Biochem J*. 1999;340:723-728.
163. Guo F.H, DeRaeve H.R, Rice T.W, et al. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:7809-7813.

-
164. Perry J.M, Marletta M.A. Effects of transition metals on nitric oxide synthase catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:11101-11106.
165. Michel E.L, Langevin R.W, Gell C.F. Effect of continuous human exposure to oxygen tension of 418 mmHg for 168 hours. *Aerospace Med*. 1960;31:138-144.
166. Feron O, Saldana F, Michel J.B, et al. The endothelial nitric oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem*. 1998;273:3125-3128.
167. Whorton A.R, Simonds D.B, Piantadosi C.A. Regulation of nitric oxide synthesis by oxygen in vascular endothelial cells. *Am J Physiol*. 1997;272:L1161-L1166.
168. Shaul P.W, Wells L.B. Oxygen modulates nitric oxide production selectively in fetal pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;11:432-438.
169. Comfield D.N, Reeve H.L, Tolarova S, et al. Oxygen causes fetal pulmonary vasodilatation through activation of a calcium-dependent potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:8089-8094.
170. Tikitsky M.H, Morin F.C III. Increasing oxygen tension dilates fetal pulmonary circulation via endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1993;265:H376-H380.
171. Harris A, Tippke S, Sievers C, et al. Acetazolamide and CO₂: acute effects on cerebral and retrobulbar hemodynamics. *J Glaucoma*. 1996;5:39-45.
172. Schmetterer L, Findl O, Strenn K, et al. Role of NO in the O₂ and CO₂ responsiveness of cerebral and ocular circulation in humans. *Am J Physiol*. 1997;273:R2005-R2012.

-
173. Fridovich I, Freeman B. Antioxidant defenses in the lung. *Ann Rev Physiol.* 1986;48:693-702.
174. Dirks C.D, Faiman M.D. Free radical formation and lipid peroxidation in rat and mouse cerebral cortex slices exposed to high oxygen pressure. *Brain Res.* 1982;248:355-360.
175. Kovachich G.B, Mishra O.P. Lipid peroxidation in rat brain cortical slices as measured by the thiobarbituric acid test. *J Neurochem.* 1980;35:1449-1452.
176. Kovachich G.B, Mishra O.P, Clark J.M. Depression of cortical Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats exposed to hyperbaric oxygen. *Brain Res.* 1981;206:229-232.
177. Zaleska M.M, Floyd R.A. Regional lipid peroxidation in rat brain in vitro: Possible role of endogenous iron. *Neurochem Res.* 1985;10:397-410.
178. Jamieson D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Radic Biol Med.* 1989;7:87-108.
179. Nishiki K, Jamieson D, Oshino N, et al. Oxygen toxicity in the perfused rat liver and lung under hyperbaric conditions. *Biochem J.* 1976;160:343-355.
180. Januskievicz A.J, Faiman M.D. The effect of in vivo hyperoxic exposure on the release of endogenous histamine from the rat isolated perfused lung. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1984;72:134-141.
181. Webster N.R, Toothill C, Cowen P.N. Tissue responses to hyperoxia: Biochemistry and pathology. *Br J Anaesth.* 1987;59:760-771.
182. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979;59:527-605.

-
183. Forman H.J, Fisher A.B. Antioxidant defenses. In: Gilbert DL, ed. Oxygen and living processes: an interdisciplinary approach. New York: Springer, 1981;235-249.
184. McCord J.M, Fridovich I. The biology and pathology of oxygen radicals. *Ann Int Med.* 1978;89:122-127.
185. McCord J.M, Keele B.B. Jr, Fridovich I. An enzyme based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971;68:1024-1027.
186. Hassan H.M, Fridovich I. Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol.* 1977a;129:1574-1583.
187. Hassan H.M, Fridovich I. Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*: Induction by methyl viologen. *J Biol Chem.* 1977b;252:7667-7672.
188. Hassan H.M, Fridovich I. Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*: The glucose effect. *J Bacteriol.* 1977c;132:505-510.
189. McCord J.M, Beauchamp C.O, Gosciniak S, et al. Superoxide and superoxide dismutase. In : King TE, Mason HS, Morrison M, eds. Oxidases and related redox systems: Proceedings of the 2nd International Symposium. Baltimore, MD: University Park Press; 1973:51-76.
190. Gardner P.R, Gardner A.M, Martin L.A et al. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:10378-10383.

191. Hausladen A, Gow A.J, Stamler J.S, et al. Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:14100-14105.
192. Arteel G.E, Briviba K, Sies H. Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett*. 1999;445:226-230.
193. Burk R.F, Hill K.E. Orphan selenoproteins. *Bioessays*. 1999;21:231-237.
194. Barron E.S.G. Oxidation of some oxidation-reduction systems by oxygen at high pressure. *Arch Biochem Biophys*. 1955;59:502-510.
195. Fisher A.B, Bassett D.J.P, Forman H.J. Oxygen toxicity of the lung: Biochemical aspects. In: Fishman AP, Renkin EM, eds. *Pulmonary edema*. Bethesda, MD: American Physiology Society. 1979; 207-216.
196. Allen J.E, Goodman D.B.P, Besarab A, et al. Studies on biochemical basis of oxygen toxicity. *Biochim Biophys Acta*. 1973;320:708-728.
197. Tierney D.F, Ayers L, Kasuyama R.S. Altered sensitivity to oxygen toxicity. *Am Rev Resp Dis*. 1977;115:59-65.
198. Crapo J.D, Sjostrom K, Drew R.T. Tolerance and cross-tolerance using NO₂ and O₂: I. Toxicology and biochemistry. *J Appl Physiol: Resp Environ Excercise Physiol*. 1978;44:364-369.
199. Tierney D.F, Ayers L, Herzog S, et al. Pentose pathway and production of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Am Rev Resp Dis*. 1973;108:1348-1351.
200. Bassett D.J.P, Fisher A.B. Glucose metabolism in rat lung during exposure to hyperbaric O₂. *J Appl Physiol Resp Environ Exercise Physiol*. 1979;45:943-949.

201. Kovachich G.B. Increased pentose shunt activity in rat brain cortical slices at elevated oxygen pressures. *Pharmacologist*. 1978;20:274.
202. Brue F, Joanny P, Morcellet J.L, et al. Metabolic defence mechanisms at the cellular level against oxygen toxicity. *Bull Eur Physiolpathol Resp*. 1978;14:152.
203. Chen Z, Chintagari N.R, Guo Y, Bhaskaran M, Chen J, Gao L, Jin N, Weng T, Liu L. Gene expression of rat alveolar type II cells during hyperoxia exposure and early recovery. *Free Radic Biol Med*. 2007;43:628-642.
204. Alcaraz-García MJ. Efectos de la hiperoxia en el crecimiento y viabilidad del neumocito tipo II. En Olea A, Alcaraz-García MJ (ed 4ª). *Medicina Subacuática e Hiperbárica*. España: Aulas del Mar. Universidad del Mar, 2007; 29-31.
205. Ahmad S, Ahmad A, Ghosh M, Leslie C.C, White C.W. Extracellular ATP-mediated signalling for survival in hyperoxia-induced oxidative stress. *J Biol Chem*. 2004;279:16317-16325.
206. Zhu H, Chang L, Li W, Liu H. Effect of amygdalin on the proliferation of hyperoxia-exposed type II alveolar epithelial cells isolated from premature rat. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2004;24:223-225.
207. Chang L.W, Zhu H.P, Li W.B, Liu H.C, Zhang Q.S, Chen H.B. Protective effects of amygdalin on hyperoxia-exposed type II alveolar epithelial cells isolated from premature rat lungs in vitro. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2005;43:118-123.

208. Warshaw J.B, Wilson C.W 3rd, Saito K, Prough R.A. The responses of glutathione and antioxidant enzymes to hyperoxia in developing lung. *Pediatr Res.* 1985;19:819-823.
209. Panus P.C, Shearer J, Freeman B.A. Pulmonary metabolism of reactive oxygen species. *Exp Lung Res.* 1988;14 Suppl:959-976.
210. Kennedy K.A, Crouch L.S, Warshaw J.B. Effect of hyperoxia on antioxidants in neonatal rat type II in vitro and in vivo. *Pediatr Res.* 1989;26:400-403.
211. Aerts C, Wallaert B, Voisin C. In vitro effects of hyperoxia on alveolar type II pneumocytes: inhibition of glutathione synthesis increases hyperoxic cell injury. *Exp Lung Res.* 1992;18:845-861.
212. Clahsen P, Moison R, Holtzer C, Berger H (1992) Recycling of glutathione during oxidative stress in erythrocytes of the newborn. *Pediatr. Res.* 32: 399-402.
213. Panus P.C, Matalon S, Freeman B.A. Responses of type II pneumocytes antioxidant enzymes to normoxic and hyperoxic culture. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1989;25:821-829.
214. Bhandari V, Maulik N, Kresch M. Hyperoxia causes an increase in antioxidant enzymes activity in adult and fetal rat type II pneumocytes. *Lung.* 2000;178:53-60.
215. Jyonouchi H, Sun S, Abiru T, Chareancholvanich S, Ingbar D.H. The effects of hyperoxic injury and antioxidant vitamins on death and proliferation of human small airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19:426-436.

216. Ahmad A, Ahmad S, Chang L.Y, Schaack J, White C.W. Endothelial Akt activation by hyperoxia: role in cell survival. *Free Radic Biol Med.* 2006;40:1108-1118.
217. Gehen S.C, Vitiello P.F, Bambara R.A, Keng P.C, O'Reilly M.A. Downregulation of PCNA potentiates p21-mediated growth inhibition in response to hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292:L716-L724.
218. Zhang X, Shan P, Sasidhar M, Chupp G.L, Flavell R.A, Choi A.M, Lee P.J. Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase ½ mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28:305-315.
219. Padgaonkar V.A, Leverenz V.R, Dang L, Chen S.C, Pelliccia S, Giblin F.J. Thioredoxin reductase may be essential for the normal growth of hyperbaric oxygen-treated human lens epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2004;79:847-857.
220. Chandel N.S, Budinger G.R. The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radic Biol Med.* 2007;42:165-174.
221. Gavino R, Johnson L, Bhandari V. Release of cytokines and apoptosis in fetal rat Type II pneumocytes exposed to hyperoxia and nitric oxide: modulatory effects of dexamethasone and pentoxifylline. *Cytokine.* 2002;20:247-255.
222. Johnson-Varghese L, Brodsky N, Bhandari V. Effect of antioxidants on apoptosis and cytokine release in fetal rat Type II pneumocytes exposed to hyperoxia and nitric oxide. *Cytokine.* 2004;28:10-16.

223. Bhandari V, Johnson L, Smith-Kirwin S, Vigliotta G, Funanage V, Chander A. Hyperoxia and nitric oxide reduce surfactant components (DSPC and surfactant proteins) and increase apoptosis in adult and fetal rat type II pneumocytes. *Lung*. 2002;180:301-317.
224. Shenberger J.S, Dixon P.S. Oxygen induces S-phase growth arrest and increases p53 and p21 (WAF1/CIP1) expression in human bronchial smooth-muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;21:395-402.
225. Johnson-Varghese L, Brodsky N, Bhandari V. Effect of antioxidants on apoptosis and cytokine release in fetal rat Type II pneumocytes exposed to hyperoxia and nitric oxide. *Cytokine*. 2004;28:10-6.
226. Guthmann F, Wissel H, Schachtrup C, Tölle A, Rüdiger M, Spener F, Rüstow B. Inhibition of TNFalpha in vivo prevents hyperoxia-mediated activation of caspase 3 in type II cells. *Respir Res*. 2005; 21:6-10.
227. Canada A.T, Herman L.A, Young S.L. An age-related difference in hyperoxia lethality: role of lung antioxidant defense mechanisms. *Am J Physiol*. 1995;268:539-545.
228. Gomi F, Matsuo M. Effects of 60% oxygen inhalation on the survival and antioxidant enzyme activities of young and old rats. *Mech Ageing Dev*. 2002;123:1295-1304.
229. Servais S, Boussouar A, Molnar A, Douki T, Pequignot JM, Favier R. Age-related sensitivity to lung oxidative stress during ozone exposure. *Free Radic Res*. 2005;39:305-16.
230. Bhandari V, Maulik N, Kresch M. Hyperoxia causes an increase in antioxidant enzyme activity in adult and fetal rat type II pneumocytes. *Lung*. 2000;178:53-60.

231. Gerik SM, Keeney SE, Dallas DV, Palkowetz KH, Schmalstieg FC. Neutrophil adhesion molecule expression in the developing neonatal rat exposed to hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29:506-512.
232. Arieli R, Ertracht O, Oster I, Vitenstein A, Adir Y. Effects of nitrogen and helium on CNS oxygen toxicity in the rat. *J Appl Physiol*. 2005;98:144-150.
233. Lightfoot RT, Khov S, Ischiropoulos H. Transient injury to rat lung mitochondrial DNA after exposure to hyperoxia and inhaled nitric oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286:23-29.
234. Eynan M, Arieli Y, Arieli R, Bomzon A. Hyperoxia may reduce energetic efficiency in the trained rat. *Aviat Space Environ Med*. 2003;74:1029-33.
235. Guohua C, Shukitt-Hale B, Bickford PC, Joseph JA, McEwen J, Prior RL. Hyperoxia-induced changes in antioxidant capacity and the effect of dietary antioxidants. *J Appl Physiol*. 1999;86:1817-1822.
236. Kim HY, Wallig MA, Picciano MF. Inorganic selenite supplementation and protection against hyperoxic injury in neonates. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2003;49:350-356.
237. Yamashita K, Tochihara Y. Effects of hyperoxia on thermoregulatory responses during feet immersion to hot water in humans. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci*. 2003;22:181-185.
238. Resnick AD, Deal EC Jr, Ingram RH Jr, McFadden ER Jr. A critical assessment of the mechanism by which hyperoxia attenuates exercise-induced asthma. *J Clin Invest*. 1979;64:541-549.

239. Harten JM, Anderson KJ, Kinsella J, Higgins MJ. Normobaric hyperoxia reduces cardiac index in patients after coronary artery bypass surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2005;19:173-175.
240. Tetzlaff K, Thorsen E. Breathing at depth: physiologic and clinical aspects of diving while breathing compressed gas. *Chin Chest Med* 2005;26:355-380.
241. María José Alcaraz, Agustín Olea, Serafín Balanza, María Dolores Ludeña y Fernando Sánchez Gascón. Influencia de las condiciones medio ambientales en la tolerancia al oxígeno en animales de experimentación. *Medicina Aeroespacial y Ambiental* 2006;6:268-274.
242. Meirovithz E, SonnJ, Mayevsky A. Effect of hyperbaric oxygenation on brain hemodynamics, hemoglobin oxygenation and mitochondrial NADH. *Brain Res Rev.* 2007;54:294-304.
243. Dueñas A. Manifestaciones clínicas y diagnóstico de las intoxicaciones agudas. En. *Intoxicaciones agudas en medicina de urgencia y cuidados críticos.* Dueñas A. ed. España: Elseiver; 1999:307.
244. Mayayo M, T Pintado, E Gómez. Protocolos clínicos: Enfermedades de la sangre. Protocolo diagnóstico de la anemia microcítica. *Medicine.* 2001;8:2722-2724.
245. Yang J, Yang M, Xu F, Li K, Lee SK, Ng PC, Tam JS, Yuen PM, Fok TF. Effects of oxygen-induced lung damage on megakaryocytopoiesis and platelet homeostasis in a rat model. *Pediatr Res.* 2003;54:344-352.
246. Torbati D, Tan GH, Smith S, Frazier KS, Gelvez J, Fakioglu H, Totapally BR. Multiple-organ effect of normobaric hyperoxia in neonatal rats. *J Crit Care.* 2006;21:85-93.

247. Welty SE, Rivera JL, Wu B. Hyperoxic increases in lung ICAM-1 mRNA are independent of TNF-alpha and IL-1 beta mRNA. *Free Radic Biol Med.* 1997;23:898-908.
248. Bryan CL, Lewis RE, Owens SL, Emanuel B, Jenkinson SG. Allopurinol inhibition of neutrophilic alveolar response during hyperoxia. *J Appl Physiol.* 1993;75:357-63.
249. Cao G, Prior R.L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem.* 1998;44:1309-1315.
250. Rusakow LS, Han J, Hayward MA, Griffith OW. Pulmonary oxygen toxicity in mice is characterized by alterations in ascorbate redox status. *J Appl Physiol.* 1995;79:1769-76.
251. Alcaraz-García M.J. Estudio molecular del estrés oxidativo en buceadores que respiran oxígeno puro (100%). En Olea A, Alcaraz-García MJ (ed 4ª). *Medicina Subacuática e Hiperbárica.* España: Aulas del Mar. Universidad del Mar, 2007:25-28.
252. Margaritis I, Palazzetti S, Rousseau A-S, Richard MJ, Favier A. Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *J Am Coll Nutr.* 2003;22:147-156.
253. Dombrowsky H, Tschernig T, Vieten G, Rau GA, Ohler F, Acevedo C, Behrens C, Poets CF, von der Hardt H, Bernhard W. Molecular and functional changes of pulmonary surfactant in response to hyperoxia. *Pediatr Pulmonol.* 2006;41:1025-1039.

254. Arkhipenko YV, Sazontova TG, Zhukova AG. Adaptation to periodic hypoxia and hyperoxia improves resistance of membrane structures in heart, liver, and brain. *Bull Exp Biol Med.* 2005;140:278-281.
255. Arieli R, Shochat T, Adir Y. CNS toxicity in closed-circuit oxygen diving: symptoms reported from 2527 dives. *Aviat Space Environ Med.* 2006;77:526-532.
256. Palazzetti S, Richard MJ, Favier A, Margaritis I. Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol.* 2003;28:588-604.
257. Powers SK, Hamilton K. Antioxidants and exercise. *Clin Sports Med.* 1999;18:525-536.
258. Rahman I, Mulier B, Gilmour PS, Watchorn T, Donaldson K, Jeffery PK, MacNee W. Oxidant-mediated lung epithelial cell tolerance: the role of intracellular glutathione and nuclear factor-kappaB. *Biochem Pharmacol.* 2001;62:787-794.
259. Rister M, Wustrow C. Effect of hyperoxia on reduced glutathione in alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes. *Res Exp Med (Berl).* 1985;185:445-450.
260. López-Torres M, Gil P, Barja de Quiroga G. Effect of hyperoxia acclimation on catalase and glutathione peroxidase activities and in vivo peroxidation products in various tissues of the frog *Rana ridibunda perezii*. *J Exp Zool.* 1988;248:7-18.
261. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Cordova A, Pons A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav.* 2005;84:1-7.

262. Lushchak VI, Bagnyukova TV, Husak VV, Luzhna LI, Lushchak OV, Storey KB. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:1670-1680.
263. Fessel JP, Porter NA, Moore KP, Sheller JR, Roberts LJ 2nd. Discovery of lipid peroxidation products formed in vivo with a substituted tetrahydrofuran ring (isofurans) that are favoured by increased oxygen tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:16713-16718.
264. Watson TA, MacDonald-Wicks LK, Garg ML. Oxidative stress and antioxidants in athletes undertaking regular exercise training. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2005;15:131-146.
265. Galassetti PR, Nemet D, Pescatello A, Rose-Gottron C, Larson J, Cooper DM. Exercise, caloric restriction, and systemic oxidative stress. *J Investig Med.* 2006;54:67-75.
266. Banfi G, Malavazos A, Iorio E, Dolci A, Doneda L, Verna R, Corsi MM. Plasma oxidative stress biomarkers, nitric oxide and heat shock protein 70 in trained elite soccer players. *Eur J Appl Physiol.* 2006;96:483-486.
267. Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Grodman R, Gunawardena R, Naidu A. Effects of oxygen on breath markers of oxidative stress. *Eur Respir.* 2003;21:48-51.
268. Lemaitre F, Meunier N, Bedu M. Effect of air diving exposure generally encountered by recreational divers: oxidative stress? *Undersea Hyperb Med.* 2002;29:39-49.

269. Comhair SAA, Thomassen MJ, Erzurum SC. Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxide synthase 2 in airways of healthy individuals exposed to 100% O₂ or cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23:350-354.
270. Wei W, Wang W, Ning Q, Luo XP. Dynamic changes in vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in lungs of premature rats after hyperoxia exposure. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2007;9:473-478.
271. Pasgaard T, Stankevicius E, Jørgensen MM, Ostergaard L, Simonsen U, Frøbert O. Hyperoxia reduces basal release of nitric oxide and contracts porcine coronary arteries. *Acta Physiol (Oxf).* 2007 Sep 4.
272. Cucchiaro G, Tatum AH, Brown MC, Camporesi EM, Daucher JW, Hakim TS. Inducible nitric oxide synthase in the lung and exhaled nitric oxide after hyperoxia. *Am J Physiol.* 1999;277:L636-L644.
273. Gu X, El-Remessy AB, Brooks SE, Al-Shabrawey M, Tsai NT, Caldwell RB. Hyperoxia induces retinal vascular endothelial cell apoptosis through formation of peroxynitrite. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285:C546-C554.
274. Nelin LD, Morrissey JF, Effros RM, Dawson CA, Schapira RM. The effect of inhaled nitric oxide and oxygen on the hydroxylation of salicylate in rat lungs. *Pediatr Res.* 2003;54:337-343.
275. Hoehn T, Felderhoff-Mueser U, Maschewski K, Stadelmann C, Sifringer M, Bittigau P, Koehne P, Hoppenz M, Obladen M, Bühner C. Hyperoxia causes inducible nitric oxide synthase-mediated cellular damage to the immature rat brain. *Pediatr Res.* 2003;54:179-184.

276. Cabigas BP, Su J, Hutchins W, Shi Y, Schaefer RB, Recinos RF, Nilakantan V, Kindwall E, Niezgoda JA, Baker JE. Hyperoxic and hyperbaric-induced cardioprotection: role of nitric oxide synthase 3. *Cardiovasc Res.* 2006;72:143-151.
277. Horst SA, Walther FJ, Poorthuis BJ, Hiemstra PS, Wagenaar GT. Inhaled nitric oxide attenuates pulmonary inflammation and fibrin deposition and prolongs survival in neonatal hyperoxic lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;293:L35-L44.
278. Hashida K, Sasaki K, Makino N. Interactions of nitric oxide and oxygen in cytotoxicity: proliferation and antioxidant enzyme activities of endothelial cells in culture. *Free Radic Res.* 2000;33:147-156.