

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**



**MODULACIÓN DE LA RESPUESTA VASCULAR AL ÓXIDO  
NÍTRICO POR LA HEMOGLOBINA Y TIOLES DE BAJO  
PESO MOLECULAR EN LA SEPSIS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Carmen Tejedor Mardomingo

Bajo la dirección de los doctores

José Ángel Lorente Balanza  
Elena Miravalles González

**Madrid, 1999**

**ISBN: 84-669-2397-7**

# TESIS DOCTORAL

**"MODULACIÓN DE LA RESPUESTA VASCULAR AL  
ÓXIDO NÍTRICO POR LA HEMOGLOBINA Y TIOLES DE  
BAJO PESO MOLECULAR EN LA SEPSIS."**

Carmen Tejedor Mardomingo

Madrid, 1999

D. JOSE ÁNGEL LORENTE BALANZA, FACULTATIVO ESPECIALISTA DEL SERVICIO DE CUIDADOS INTENSIVOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE GETAFE, JUNTO CON DÑA. ELENA MIRAVALLS GONZÁLEZ, JEFE DE SERVICIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA DE DICHO HOSPITAL

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Modulación de la respuesta vascular al óxido nítrico por la hemoglobina y tioles de bajo peso molecular en la sepsis”, presentada por Dña. CARMEN TEJEDOR MARDOMINGO para optar al título de Doctor en Farmacia, constituye un trabajo original de investigación, que ha sido realizado bajo nuestra dirección en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Getafe (Madrid).

En Madrid, diez de enero de mil novecientos noventa y nueve.

Fdo. J.A. Lorente Balanza

E. Miravalles González

Directora: Sr. D. CARMEN TEJEDOR MARDOMINGO

Presidente: Sr. Dr. C. MARTINEZ HONDUVILLA

Vocales: Sr. Dr. J. ZULUETA FRANCES

Vocales: Sr. Dr. L. RODRIGUEZ MAÑAS

Vocales: Sr. Dr. R. GOBERNA ORTIZ.

Secretaría: Sr. Dr. V. LAHERA JULIA

Este trabajo ha sido realizado en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Getafe con la colaboración de los servicios de Cuidados Intensivos, Bioquímica Clínica, Cirugía General y Anatomía Patológica del citado hospital.

Ha sido subvencionado  
por ayudas FIS nº 98/0196.

There is occasions and causes, why and  
wherefore in all things.

William Shaskespeare: *Henry V*, v, 1599

A mis padres,  
A Ernesto.

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no ha sido una labor individual; ha sido fruto del trabajo, los conocimientos, la colaboración y el empeño de muchas personas. El desarrollo de un proyecto tan plural como éste, ha requerido el esfuerzo de muchos profesionales que han colaborado en equipo, tanto desde el punto de vista científico, como técnico y personal. El Dr. Delgado y el Dr. Tobalina del Servicio de Cirugía General del H.U. de Getafe han llevado a cabo todos los procedimientos quirúrgicos y han participado intensamente en tareas de diversa índole. El Dr. Mon, intensivista de la UCI del H.U. de Getafe y la Dra. Hervás, anestesista del H. Gregorio Marañón, han permitido el desarrollo de este experimento al que han dedicado gran parte de su tiempo. La Dra. Martín junto con la Dra. Fernández-Segoviano, Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del H.U de Getafe, han llevado a cabo el estudio histológico y gracias a su capacidad de innovación y trabajo se han desarrollado nuevas técnicas. La labor del personal de enfermería (Francisco Soto, Amelia Moscoso, Diego Ayuso y Javier Blázquez), que ha contribuido con una dedicación admirable, ha sido clave para el éxito de este proyecto. La aportación de la Dra. Gross, microbióloga del H.U de Getafe, ha sido un riguroso trabajo que ha exigido de ella una gran constancia. El tiempo que he trabajado con todos ellos será para mí, siempre un grato y entrañable recuerdo.

Gracias a la Dra. Miravalles, jefe del Servicio de Bioquímica Clínica y al Dr. Esteban, jefe de la Unidad de Cuidados Intensivos del H.U. de Getafe por su asesoramiento, colaboración y por haber puesto a mi disposición los medios necesarios para el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a todos mis compañeros del Servicio de Bioquímica Clínica (Dra. de Paula, Dr. Rodríguez, Dr. Pascual, Dr. González etc.) la ayuda desinteresada que siempre he recibido de ellos cuando la he necesitado.

Debo una mención especial al Dr. Lorente, investigador principal del proyecto, director de esta tesis y amigo personal que ha estado a mi lado todo este tiempo. A él le debo gran parte de lo que he aprendido durante este periodo y le agradezco profundamente la confianza que ha depositado en mí.

Agradezco a Elena Villamañán la paciencia y comprensión que ha derrochado en la convivencia conmigo durante la realización de este trabajo.

Por último, quiero dedicar esta tesis a Ernesto y a mis padres; ellos han sido el verdadero motor personal que ha impulsado y alentado mi trabajo. Sin ellos no hubiera sido posible.

# CONTENIDOS

Página

<b>I. INTRODUCCION</b>	1
1. La "respuesta séptica": ¿qué es el shock séptico?	2
2. Alteraciones hemodinámicas en la sepsis	5
2.1 - Vasodilatación sistémica.	5
2.2 - Efectos en la microcirculación.	7
- Fisiología y regulación del flujo esplácnico.	8
2.3 - Alteraciones en la extracción tisular de oxígeno.	9
3. Alteraciones bioquímicas en la sepsis.	10
3.1 - Alteraciones en la glucólisis: hiperlactatemia.	11
3.2.- Alteraciones en el metabolismo proteico.	14
3.3.- Alteraciones en el metabolismo lipídico.	15
3.4 - $pH_i$ : indicador bioquímico de hipoperfusión.	16
- Significado de la $pCO_2$ tisular.	18
4. Óxido Nítrico.	21
4.1 - Biosíntesis del óxido nítrico.	22
4.2 - Reactividad.	23
4.3 - Metabolismo del NO.	24
5. Función del "NO" en los cambios inducidos por la sepsis.	26
5.1 - El "NO" en el metabolismo oxidativo y daño celular séptico.	26
- Mecanismo de la lesión mediada por NO: $ONOO^-$ .	28
5.2 - Efectos hemodinámicos del NO en la sepsis.	33
5.3 - El NO y la fisiopatología gastrointestinal de la sepsis.	34
6. S-nitrosotioles.	37
6.1 - Producción endógena de nitrosotioles.	39
6.2 - Efectos fisiopatológicos de los RSNOs.	40
6.3 - Mecanismo de acción.	42
6.4 - Los RSNOs como posibles responsables de la actividad del EDRF.	44
7. Efecto vasopresor de la Hb: interacción con NO y RSNOs.	46
7.1 - ¿Por qué los hematíes no poseen el efecto vasopresor de la Hb?	51
- Efecto del glutation sobre la reactividad del NO.	52
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.</b>	56
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	59
A. Modelo de sepsis experimental.	60
B. Protocolo de estudio.	60
C. Monitorización.	63
D. Fármacos utilizados.	64
E. Cálculos hemodinámicos.	65
F. Preparación del inóculo bacteriano.	65
G. Técnicas hematológicas.	68
F. Determinación de S-nitrosotioles.	71
G. Determinación de nitratos y nitritos	76
H. Otras determinaciones bioquímicas.	81

I. Aislamiento y purificación de Hb. . . . .	84
J. Estudio inmunohistoquímico. . . . .	84
K. Análisis estadístico. . . . .	88
L. Modelo clínico de sepsis grave y shock séptico. . . . .	89
<b>IV. RESULTADOS. . . . .</b>	<b>91</b>
<b>1. Efecto de la sepsis. . . . .</b>	<b>92</b>
<b>1.1 Evolución hemodinámica de la sepsis. . . . .</b>	<b>92</b>
A) Frecuencia cardiaca. . . . .	92
B) Presión arterial media. . . . .	93
C) Presión arteria pulmonar. . . . .	94
D) Índice cardiaco. . . . .	95
E) Resistencia vascular sistémica. . . . .	96
F) Flujo mesentérico. . . . .	96
G) Flujo portal. . . . .	97
H) Distribución del flujo mesentérico. . . . .	98
I) Distribución del flujo portal. . . . .	99
J) Resistencia vascular mesentérica. . . . .	99
<b>1.2- Cambios bioquímicos en la sepsis. . . . .</b>	<b>101</b>
A) pH. . . . .	101
B) Lactato. . . . .	101
C) Triglicéridos. . . . .	102
D) Glucosa. . . . .	103
E) Creatinina. . . . .	104
F) Urato. . . . .	104
G) Urea. . . . .	105
H) Proteínas Totales. . . . .	105
I) Albúmina. . . . .	106
J) Bilirrubina total. . . . .	106
K) Bilirrubina directa. . . . .	107
L) $\gamma$ -glutamilttransferasa. . . . .	107
N) Lactatodeshidrogenasa. . . . .	108
N) Aspartatoaminotransferasa. . . . .	109
O) Fosfatasa alcalina. . . . .	110
P) Fosfatemia. . . . .	110
Q) Calcemia. . . . .	111
R) Ión Sodio. . . . .	111
S) Ión Cloruro. . . . .	112
T) Ión Potasio. . . . .	112
U) Leucocitos. . . . .	113
V) Indicador bioquímico de hipoperfusión: $pCO_{2i}$ - $pCO_{2A}$ . . . . .	113
w) Pámetros indicadores de la producción de NO. . . . .	114
- RSNOs. . . . .	114
- Nitratos y nitritos. . . . .	115
<b>2. Efectos hemodinámicos de la hemoglobina. . . . .</b>	<b>117</b>
A) Acción de la Hb sobre la frecuencia cardiaca. . . . .	117
B) Acción de la Hb sobre la presión arterial media. . . . .	118
C) Acción de la Hb sobre la presión en arteria pulmonar. . . . .	118
D) Acción de la Hb sobre el índice cardiaco. . . . .	119
E) Acción de la Hb sobre la resistencia vascular sistémica. . . . .	120
F) Acción de la Hb sobre el flujo mesentérico. . . . .	121



G) Acción de la Hb sobre la resistencia vascular mesentérica. . . . .	121
H) Acción de la Hb sobre el flujo portal. . . . .	122
I) Acción de la Hb sobre la redistribución de flujo. . . . .	123
<b>3. Efecto dosis-respuesta de la hemoglobina. . . . .</b>	<b>125</b>
A) Efecto dosis-respuesta sobre la frecuencia cardiaca. . . . .	125
B) Efecto dosis-respuesta sobre la presión arterial media. . . . .	126
C) Efecto dosis-respuesta sobre la presión en la arteria pulmonar. . . . .	127
D) Efecto dosis-respuesta sobre el índice cardiaco. . . . .	127
E) Efecto dosis-respuesta sobre la resistencia vascular sistémica. . . . .	128
F) Efecto dosis-respuesta sobre el flujo mesentérico. . . . .	129
G) Efecto dosis-respuesta sobre la resistencia vascular mesentérica. . . . .	129
H) Efecto dosis-respuesta sobre el flujo portal. . . . .	130
I) Efecto dosis-respuesta sobre la ratio $Q_{mes}/IC$ . . . . .	131
J) Efecto dosis-respuesta sobre la ratio $Q_p/IC$ . . . . .	131
<b>4. Efecto hemodinámicos del GSH. . . . .</b>	<b>132</b>
A) Efecto del GSH sobre la presión arterial media. . . . .	133
B) Efecto del GSH sobre la frecuencia cardiaca. . . . .	133
C) Efecto del GSH sobre la presión en la arteria pulmonar. . . . .	134
D) Efecto del GSH sobre el índice cardiaco. . . . .	134
E) Efecto del GSH sobre la resistencia vascular sistémica. . . . .	135
F) Efecto del GSH sobre el $Q_{mes}$ . . . . .	136
G) Efecto del GSH sobre el $Q_p$ . . . . .	137
H) Efecto del GSH sobre la resistencia vascular mesentérica. . . . .	139
I) Efecto del GSH sobre la redistribución de flujo. . . . .	141
<b>5. Estudio histológico. . . . .</b>	<b>143</b>
1.- Estudio del intestino delgado. . . . .	143
A) Tinción hematoxilina-eosina. . . . .	143
B) Estudio inmunohistoquímico: nitrotirosina. . . . .	144
2.- Estudio hepático. . . . .	149
A) Tinción hematoxilina-eosina. . . . .	149
B) Estudio inmunohistoquímico: nitrotirosina. . . . .	150
3.- Estudio renal. . . . .	150
A) Tinción hematoxilina-eosina. . . . .	150
B) Estudio inmunohistoquímico: nitrotirosina. . . . .	150
4.- Estudio pulmonar. . . . .	151
<b>Sepsis humana . . . . .</b>	<b>152</b>
<b>V. ANEXO ESTADÍSTICO. . . . .</b>	<b>154</b>
<b>VI. DISCUSIÓN. . . . .</b>	<b>206</b>
<b>Crítica al método. . . . .</b>	<b>207</b>
1. El diseño experimental no es adecuado. . . . .	207
1.1 Sepsis porcina. . . . .	207
A) ¿Por qué esta especie animal? . . . . .	208
B) ¿Existen variables de confusión en nuestro modelo? . . . . .	208
C) ¿Es apropiado el estímulo séptico empleado? . . . . .	210
1.2 Sepsis humana. . . . .	211
2. No son válidos los parámetros estimadores de la síntesis de NO. . . . .	211
3. La nitrotirosina como bioindicador de la lesión mediada por ONOO <sup>•</sup> . . . . .	213
4. No se ha considerado qué factores influyen en los efectos de la Hb. . . . .	215
5. ¿Puede el GSH modular la unión Hb-NO? . . . . .	217
6. El análisis estadístico no es aplicable a este modelo. . . . .	218

<b>Discusión de Resultados</b> .....	221
1. Cambios producidos por la sepsis. ....	221
1.1 Cambios hemodinámicos. ....	221
1.2 Alteraciones bioquímicas y hematológicas. ....	225
1.3 Expresión inmunohistoquímica de daño mediado por ONOO <sup>-</sup> . ...	230
2. Efectos de la hemoglobina. ....	235
3. Acciones sistémicas. ....	235
3.1 Efectos hemodinámicos regionales. ....	237
3.2 la Hb provoca lesión por peroxinitritos en animales control. ....	240
4. Efectos vasculares del GSH. ....	244
4.1 El GSH y las reacciones de transnitrosación con Hb. ....	244
4.2 Efecto del GSH en animales no tratados con Hb. ....	249
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	254
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	256

## ABREVIATURAS

- AGL: ácidos grasos libres.
- ALT: alanina aminotransferasa.
- AST: aspartato aminotransferasa.
- BT: bilirrubina total.
- BD: bilirrubina directa.
- BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiopterina.
- CisNO: nitrosocisteína.
- DO<sub>2</sub>: Demanda sistémica de oxígeno.
- EDRF: factor relajador derivado del endotelio.
- eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial.
- ERO: especies reactivas de oxígeno.
- Fig: figura.
- $\gamma$ -GT: gamma glutamil transferas.
- GC: gasto cardiaco.
- GK: glucoquinasa.
- GPO: glicerolfosfatooxidasa.
- GSH: glutation reducido.
- GSSG: glutation oxidado.
- GSNO: S-nitrosoglutation .
- G-6PDH: glucosa 6-fosfatodeshidrogenasa.
- FAD: flavinadenín dinucleótido.
- FMN: flavinmononucleótido.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno.
- Hb: hemoglobina.
- HK: hexoquinasa.
- IC: índice cardiaco.
- IGF: insulin-like growth.
- iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.
- L/P: cociente lactato/piruvato.
- LDH: lactato deshidrogenasa.
- M-NO: aductos nitrosilo con metales de transición.
- MDH: malatodeshidrogenasa.
- MetHb: metahemoglobina.
- nNOS: óxido nítrico sintasa neuormal.
- NO: óxido nítrico.
- NO<sup>•</sup>: óxido nítrico radical libre.
- NO<sup>+</sup>: ión nitrosonium.
- NO<sup>-</sup>: anión nitroxilo.
- NO<sub>2</sub>: dióxido de nitrógeno.
- NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: nitritos.
- NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: nitratos.
- NOHb: nitrosohemoglobina.
- NOS: óxido nítrico sintasa.
- O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: anión superóxido.
- OH<sup>•</sup>: radical hidroxilo.
- ONOO<sup>-</sup>: peroxinitritos.
- PAM: presión arterial media.
- PARS: poli (ADP-ribosa)-sintetasa.
- PAF: factor activador de plaquetas.
- PDH: piruvato deshidrogenasa.
- PCO<sub>2i</sub>: presión parcial de CO<sub>2</sub> intraluminal.
- pH<sub>i</sub>: pH intramucoso.
- Q<sub>p</sub>: flujo portal.
- Q<sub>m</sub>: flujo mesentérico.
- RIS: Respuesta inflamatoria sistémica.
- RSNOs: nitrosotioles o tionitritos.
- RSNOs-BPM: nitrosotioles de bajo peso molecular.
- RVM: resistencia vascular mesentérica
- RVS: resistencia vascular sistémica .
- -SH: grupo tiol.
- TAG: triacilglicerol.
- TG: triglicéridos.
- TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral.
- SaO<sub>2</sub>: saturación arterial de oxígeno.
- SvO<sub>2</sub>: saturación venosa de oxígeno.
- SDMO: síndrome de disfunción multiorgánico.
- SOD: superóxidodismutasa.
- VO<sub>2</sub>: consumo de oxígeno.
- VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

# ***INTRODUCCIÓN***

Este trabajo está destinado a estudiar los mecanismos que contribuyen a los cambios cardiovasculares en la sepsis y la modulación de estos efectos por la hemoglobina (Hb) y el glutatión (GSH). Para introducir este tema es conveniente tratar los siguientes puntos:

1. Qué se entiende actualmente por sepsis y shock séptico.
- 2.Cuál es el perfil hemodinámico y cardiovascular característico de la sepsis.
3. En qué consisten los cambios bioquímicos de la sepsis.
- 4.Cuál es el papel que se atribuye al óxido nítrico (NO) en las alteraciones hemodinámicas de la sepsis y la función biológica de los nitrosotioles (RSNOs) como producto relacionado.
5. La Hb como captador de NO y su repercusión hemodinámica.
6. El GSH como molécula potencialmente influyente en el metabolismo del NO intraeritrocitario.

## 1. LA “RESPUESTA SÉPTICA”. ¿QUÉ ES EL SHOCK SÉPTICO?

La sepsis y el síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) son un fenómeno clínico de extraordinaria relevancia en las unidades de cuidados intensivos; se estima que causan el 60% de la muertes producidas en dichas unidades<sup>1,2</sup>. A pesar de su repercusión, no está aún dilucidada íntegramente la patología precisa que contribuye al desarrollo de este estado y la terapia hemodinámica actual resulta insuficiente.

Para abordar el problema, es imprescindible el establecimiento de un diagnóstico preciso. En 1991, la “American College of Chest Physicians” junto con la “Society of Critical Care Medicine” definieron los siguientes conceptos<sup>3</sup>:

- **Infeción:** fenómeno microbiano caracterizado por la invasión de microorganismos o sus toxinas en tejidos normales estériles.
- **Sepsis:** Respuesta inflamatoria sistémica (RIS) provocada por una infección. Los signos clínicos de la sepsis revelan desde el punto de vista bioquímico la liberación de diversos mediadores inflamatorios.
- **Shock séptico:** Sepsis con hipotensión (presión sistólica < 90 mmHg o una reducción de 40 mmHg con respecto a la basal) a pesar de una resucitación adecuada junto con disfunción de órganos y signos de hipoperfusión en ausencia de otras causas conocidas que puedan generar dichas anomalías.
- **Síndrome de disfunción multiorgánica:** Presencia de alteración orgánica aguda, de tal forma que la homeostasis no pueda ser mantenida sin intervención. En un principio el SDMO es el resultado directo de una agresión, aunque secundariamente este síndrome se desarrolla como consecuencia de la respuesta del huésped en un contexto de RIS.
- **Síndrome de respuesta de inflamación sistémica (SRIS):** respuesta de inflamación sistémica de iguales características que la séptica (taquicardia, hipotensión etc.) sin que exista proceso infeccioso.

El **DIAGNÓSTICO DE SEPSIS** debe considerarse cuando se cumplen al menos **dos** de los siguientes criterios diagnósticos<sup>3,4</sup>:

1. Temperatura > 38°C o < 36°C.
2. Frecuencia cardiaca > 90 latidos/min.
3. Frecuencia respiratoria > a 20 inspiraciones/min ó pCO<sub>2</sub> arterial < de 32 mm Hg.
4. Recuento leucocitario > 12000 leucocitos/μL ó <4000 leucocitos/μL.

La causa inmediata más frecuente de muerte de los enfermos con sepsis o SRIS es la hipotensión refractaria a tratamiento a pesar de dosis progresivamente crecientes de agentes presores.

Numerosos estudios han sugerido que la disfunción celular y orgánica junto con el fallo multiorgánico tienen lugar en la presentación inicial de la sepsis<sup>5,6,7,8,9</sup>. El fracaso multiorgánico es considerado como un síndrome debido a que son numerosas las causas que pueden originar su desarrollo a través de una patogénesis común. Cuando se propuso el SDMO como entidad clínica definida, parecía claro que la infección y la respuesta del organismo a la infección eran la causa de este síndrome<sup>10</sup>. Los estudios iniciales sobre el SDMO indicaron que esta entidad aparecía frecuentemente tras una infección oculta, más comúnmente en la cavidad peritoneal<sup>11,12,13</sup>. Fry y colaboradores demostraron que más del 90% de los pacientes con fracaso multiorgánico de dos o más órganos presentaban un foco oculto de infección<sup>14</sup>. En otros estudios, se propuso que el fracaso multiorgánico no explicado en un enfermo quirúrgico era un signo fiable de la existencia de una infección oculta<sup>15,16</sup>. Posteriormente se ha demostrado que la infección no es necesaria ni suficiente para el desarrollo de este síndrome. La infección no sólo no es la causa más frecuente de fracaso multiorgánico<sup>17,18</sup>, sino que el tratamiento antibiótico es insuficiente para prevenir o controlar el curso de este síndrome<sup>19</sup>.

Las manifestaciones clínicas de la sepsis (fiebre, leucocitosis, estado hipercatabólico, circulación hiperdinámica) parecen estar causadas por mediadores inflamatorios que son liberados tras la interacción de los microorganismos con las

células del huésped y la respuesta del organismo es independiente del estímulo. Esta respuesta, "respuesta séptica", puede desencadenarse ante gérmenes gramnegativos, gérmenes grampositivos, virus, hongos o por infusión experimental de diversos mediadores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral<sup>20</sup>, interleukina-1<sup>21</sup> interleukina-2<sup>22</sup> y factor activador de las plaquetas<sup>23</sup>; así como por insultos no infecciosos (trauma, cirugía, hemorragia, pancreatitis...). La administración de estos mediadores reproduce los cambios hemodinámicos característicos de la sepsis así como la disfunción de otros órganos remotos similar a la observada en pacientes con fracaso multiorgánico. La diversidad de la naturaleza química de estos mediadores y de los estímulos que inducen su liberación han llevado al concepto de que el fracaso multiorgánico es una vía final común de respuesta del organismo ante diversos tipos de estímulos<sup>24</sup>.

Por tanto, el fracaso multiorgánico no es un signo de una infección descontrolada sino de una "sepsis descontrolada". El SDMO es la expresión de una respuesta inflamatoria inapropiada y generalizada ante un estímulo severo, el cual puede ser o no de origen bacteriano<sup>2</sup>. Muchas de las cuestiones relacionadas con este síndrome están aún por desarrollar; como la selección de parámetros clínicos y bioquímicos óptimos para caracterizar la evolución de la sepsis, el conocimiento profundo de la fisiopatología vascular etc. Las alteraciones hemodinámicas y bioquímicas que se producen en la sepsis están muy relacionadas con el objetivo del presente estudio.



## 2. ALTERACIONES HEMODINAMICAS EN LA SEPSIS

El perfil hemodinámico que caracteriza a la sepsis se conoce desde hace varios años. La primera descripción razonada de la hiporeactividad vascular debida a la administración de endotoxina en mamíferos fué realizada por Gilbert en 1960<sup>25</sup>. Sin embargo, a pesar del tiempo transcurrido, no se conocen los mecanismos por los que se produce.

### Perfil hemodinámico característico de la sepsis:

- Cambios cardiovasculares caracterizados por una vasodilatación sistémica,
- Anormal regulación de la microcirculación que conduce a una relación patológica entre el transporte y consumo de oxígeno;
- Disminución de la respuesta vasoconstrictora.

### 2.1) VASODILATACIÓN SISTÉMICA

El shock séptico se caracteriza por hipotensión y descenso de la reactividad a agentes vasoconstrictores<sup>26,27</sup>. Aunque una revisión de la literatura no permite obtener conclusiones definitivas sobre si la sepsis experimental induce una disminución o un aumento de la respuesta vascular<sup>28</sup> la experiencia clínica indica que los enfermos con sepsis presentan una disminución de la respuesta presora a agentes vasoactivos. De hecho, la causa más común de fallecimiento de los enfermos con sepsis no está relacionada con el motivo que originó su ingreso ni con la hipoxemia resultante del fracaso respiratorio, sino con la hipotensión refractaria a dosis progresivamente crecientes de agentes vasoconstrictores. Descripciones ya antiguas indican que los agentes presores administrados a enfermos con sepsis no producen los mismos efectos que en sujetos normales<sup>29</sup>.

La importancia clínica de este problema viene ilustrada por la relación que existe entre la disminución de la resistencia vascular y el pronóstico de estos pacientes<sup>30</sup>. En un estudio reciente, nuestro grupo ha analizado la respuesta cardiovascular y de las variables de transporte de oxígeno, a la infusión intravenosa continua de dobutamina en

un grupo de enfermos con síndrome de distress respiratorio del adulto de origen séptico<sup>31</sup>. La hipótesis era que los enfermos que subsiguientemente fallecieran presentarían probablemente una situación hemodinámica más deteriorada que los supervivientes. En contra de lo esperado, observamos que ningún parámetro hemodinámico diferenciaba ambos grupos. Sin embargo, sí existían diferencias significativas en su respuesta a la dobutamina. Ambos grupos presentaron aumentos en el gasto cardíaco y en el transporte y consumo de oxígeno. La recta de regresión lineal que une los puntos del diagrama transporte/consumo de oxígeno muestra una correlación significativa para ambos grupos, pero los supervivientes presentaban una pendiente mayor, indicando que la capacidad de utilizar el oxígeno ofertado era mayor en los supervivientes que en los que iban a fallecer. Por otro lado, la disminución de la resistencia vascular durante la infusión de dobutamina era mayor en el grupo de fallecidos. Este interesante hallazgo sugiere que los que fallecen presentan una menor capacidad de mantener el tono vascular ante una intervención farmacológica de naturaleza vasodilatadora.

Los mecanismos que conducen a la pobre respuesta vascular vasoconstrictora no son aún bien conocidos<sup>32,33,34</sup>. Se ha propuesto que la endotoxina o varias citokinas serían responsables de esta hiporespuesta vascular<sup>35,36</sup>. Otros mecanismos implicados podrían ser un aumento de la liberación de metabolitos de la ciclooxigenasa o una disminución de la disponibilidad de calcio en el aparato contráctil de la pared vascular<sup>37,38</sup>. La contracción vascular inducida por potasio también está disminuida en la sepsis, lo que sugiere que otros mecanismos además de los que afectan a la activación de los receptores alfa adrenérgicos están implicados<sup>40</sup>.

No sólo la respuesta a fármacos vasoconstrictores está disminuida en la sepsis, sino también la respuesta a agentes vasodilatadores dependientes del endotelio<sup>41,42</sup>. Este fenómeno puede deberse a una disminución en la producción de NO o a una alteración en los mecanismos de transducción para la acción de los vasodilatadores dependientes del endotelio. En este sentido, se sabe que la liberación del factor relajador derivado del endotelio (EDRF) está disminuida en vasos procedentes de ratas tratadas con endotoxina<sup>43</sup> y en vasos tratados directamente con endotoxina<sup>44</sup> o interleukina-1<sup>45</sup>. La ausencia de vasodilatación dependiente del endotelio en la sepsis podría dar lugar a áreas de vasoconstricción e hipoxia tisular, incluso en el contexto de una situación

caracterizada predominantemente por una vasodilatación sistémica. De hecho, se ha descrito en la sepsis un aumento de la concentración de varios agentes vasoconstrictores, como la endotelina o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas<sup>46,47,48</sup>.

Por lo tanto, parece que existe una interacción entre sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras que conduce a un perfil cardiovascular complejo en el que la vasodilatación sistémica coexiste con vasoconstricción regional e hipoxia tisular.

## 2.2) EFECTOS en la MICROCIRCULACIÓN

La microcirculación sufre alteraciones profundas en el shock séptico. Los cambios que se producen incluyen vasoconstricción arteriolar y enlentecimiento del flujo capilar debido al descenso de la presión de perfusión resultante de la disminución de la presión sistémica<sup>49</sup>. Este hecho va acompañado del desvío de fluido sanguíneo de los canales arteriovenosos, implicando que importantes áreas de intercambio capilar queden deficientemente perfundidas. El descenso del flujo capilar durante el shock produce como consecuencia un estado de hipoperfusión debido a:

- Descenso de la presión de perfusión<sup>49</sup>.
- Coagulación intravascular diseminada<sup>50</sup>.
- Disminución de la deformabilidad de leucocitos y hematíes<sup>51,52</sup>. La conservación de la deformabilidad eritrocitaria es fundamental en el mantenimiento de una adecuada perfusión. Cuando dicha deformabilidad disminuye, el tiempo de tránsito capilar aumenta potenciando el bloqueo del flujo capilar. Las causas que la provocan incluyen acidosis, hipotermia y la presencia de leucocitos<sup>51</sup>.
- Constricción arteriolar<sup>53</sup>.
- Presencia de fragmentos circulantes obstructivos, incluida la Hb<sup>49</sup>. Además de su efecto obstructivo, la capacidad de la Hb como captador de NO puede contribuir también al fallo microcirculatorio.

- Aumento de la adherencia celular a membranas epiteliales de capilares venulares, generando un incremento de la resistencia al flujo.
- Pérdida de fluido a través de un intercambio transcapilar anormal<sup>54</sup>, que origina transferencia de fluidos del compartimento intravascular al extravascular produciendo un descenso progresivo del gasto cardíaco.
- Cambios diferenciales en la resistencia vascular de distintos lechos vasculares (ejemplo: músculo frente a intestino)<sup>55</sup>.
- Relativa ausencia de control neurohumoral en los pequeños segmentos vasculares de la circulación<sup>56</sup>.

Durante el shock séptico, la función normal de las células endoteliales (modulación del tono vascular, el flujo sanguíneo local, la pérdida de fluidos y proteínas plasmáticas en los tejidos, la acumulación y extravasación de leucocitos en los tejidos y la influencia de la activación leucocitaria) están alteradas, contribuyendo a la disfunción vascular y posiblemente al SDMO asociados a la sepsis.

### **Fisiología y regulación del flujo esplácnico**

Los órganos esplácnicos (hígado, estómago, intestino delgado, bazo y páncreas) reciben un aporte sanguíneo cuya fisiología es enormemente compleja y constituye la más amplia de las circulaciones regionales. Se estima que en condiciones basales contiene el 20-25% del volumen sanguíneo sistémico (1500 mL/min) y recibe aproximadamente el 25% del gasto cardíaco<sup>57</sup>. Los factores que influyen en su regulación son muy diversos: neuronales<sup>58</sup>, humorales (angiotensina II y vasopresina causan un efecto vasoconstrictor esplácnico y otros mediadores como adenosina y prostaglandina E<sub>1</sub> causan vasodilatación<sup>59,60</sup>) y factores de control local.

El NO, junto con otros mediadores vasoactivos, aparece como un factor regulador esencial. Las fuentes productoras de NO en estos órganos incluyen el epitelio intestinal, musculatura lisa, plexos nerviosos y leucocitos incluyendo los infiltrados. En situación basal, la perfusión de la mucosa es controlada por el NO derivado del endotelio del lecho vascular mesentérico. El NO puede actuar como protector de la mucosa inhibiendo el acúmulo de neutrófilos mediante “down-regulation” de la

expresión de moléculas de adhesión leucocitaria CD11/CD18 en la superficie de la membrana<sup>61</sup>. El NO estabiliza los mastocitos intestinales, previniendo la liberación de mediadores inflamatorios<sup>61</sup>.

### 2.3) ALTERACION en la EXTRACCIÓN TISULAR de OXÍGENO

La tercera alteración cardiovascular en la sepsis relacionada con los mecanismos de regulación del tono vascular es el desequilibrio que se produce entre el transporte y consumo de oxígeno. Esta anomalía se produce por la alteración de los mecanismos de regulación de la microcirculación que permiten acoplar adecuadamente la extracción y el transporte de oxígeno.

La relación normal entre el transporte y el consumo de oxígeno es bifásica. El consumo de oxígeno es independiente del transporte para valores de transporte por encima del conocido como crítico. El valor crítico del transporte de oxígeno es aquel por debajo del cual el consumo ya no se mantiene constante y comienza a disminuir. Para valores de transporte de oxígeno mayores del crítico, cambios compensatorios en el flujo regional y en la extracción tisular de oxígeno permiten que se mantenga constante el consumo de oxígeno aunque el transporte oscile en amplios rangos. Sin embargo, cuando el transporte de oxígeno disminuye excesivamente, los mecanismos de compensación quedan agotados y el consumo de oxígeno no puede seguir manteniéndose: se hace "dependiente" del transporte. En este rango, cambios en el transporte son seguidos por cambios paralelos en el consumo de oxígeno, y aparece acidosis láctica y disfunción celular<sup>63,64</sup>.

La relación entre el consumo y el transporte de oxígeno en enfermos con sepsis es anormal: el consumo de oxígeno cambia cuando se producen cambios en el transporte, aún para valores de transporte de oxígeno por encima del valor crítico<sup>65,66</sup>. Este hecho sugiere que existe una incapacidad del sistema cardiovascular para satisfacer las demandas tisulares de oxígeno<sup>63</sup> y es compatible con la existencia de una alteración en

la regulación de la microcirculación. Rashkin y cols (1986)<sup>67</sup> relacionaron la muerte con la presencia de valores bajos de transporte de oxígeno y elevaciones del lactato en sangre. En base a estos y otros hallazgos, se ha propuesto que una disregulación de los procesos circulatorios que gobiernan la disponibilidad de oxígeno a nivel tisular lleva a la disfunción de los órganos en la sepsis<sup>68,69</sup>.

Lorente<sup>70</sup> y colaboradores llegaron a conclusiones similares a las de Powers y Danek en un estudio comparativo de los efectos de la dobutamina con los de la transfusión de sangre (dos formas diferentes de aumentar el transporte de oxígeno), indicando además que el consumo de oxígeno depende más del gasto cardíaco que del valor global de transporte de oxígeno.

La opinión de muchos autores es que la relación entre el transporte y consumo de oxígeno, al menos en algunos modelos sépticos, es anormal. Este fenómeno es otra prueba que sugiere que la regulación del tono vascular en la sepsis anormal<sup>71</sup>.

### 3. ALTERACIONES BIOQUÍMICAS EN LA SEPSIS

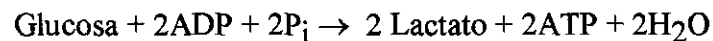
En el shock séptico, además de las alteraciones hemodinámicas, acontecen importantes anormalidades metabólicas entre las que destacan el incremento de la concentración plasmática de lactato, la acidosis metabólica, la potenciación de la vía glucolítica y un anormal balance del aporte de oxígeno respecto a su demanda tisular. Han sido numerosas las teorías que han tratado de dilucidar los mecanismos implicados y a pesar de esta aparente diversidad, todas las hipótesis podrían agruparse en torno a dos enfoques fundamentales:

- 1-Los cambios se deben a la hipoxia celular resultante del descenso del flujo microcirculatorio que se produce en la sepsis.
- 2-Las lesiones se producen por daño tisular directo, provocando defectos en la producción energética celular.

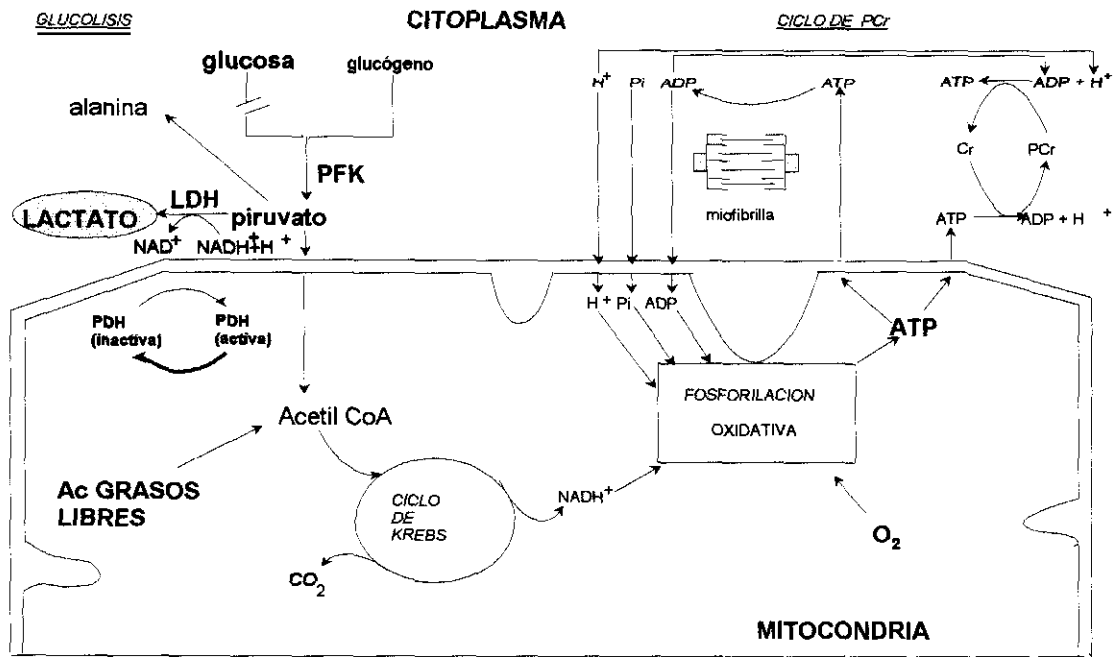
Recientemente, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías como la resonancia magnética nuclear, se han podido realizar estudios metabólicos más exhaustivos que sugieren que ninguna de las dos causas justifican en su totalidad los cambios bioquímicos que se producen<sup>72</sup>.

### 3.1) HIPERLACTATEMIA

Desde el punto de vista metabólico, una de las características fundamentales de la sepsis es la acidosis láctica<sup>73</sup>. Kreisberg<sup>74</sup> definió la existencia de acidosis láctica como el incremento de la concentración plasmática de lactato superando los valores de 4-5mmol/L asociados a un descenso simultáneo del pH arterial y de las concentraciones de bicarbonato plasmático. La acidosis láctica puede desarrollarse durante el shock séptico por perfusión celular insuficiente; ya que si el aporte de oxígeno es inadecuado se incrementa la producción anaerobia de ATP mediante potenciación de la glucólisis anaerobia:



El lactato no es responsable en sí mismo de la acidosis; ésta se produce por hidrólisis continua de ATP:  $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+$ , lo que implica liberación de hidrogeniones ( $\text{H}^+$ ) (Fig I-1). Por lo tanto, es posible un aumento de las concentraciones plasmáticas de lactato sin que se produzca acidemia. Durante la hipoxia celular, al potenciarse la vía glucolítica, se produce un incremento en la producción de piruvato, junto con hidrólisis de ATP y el consiguiente incremento de  $\text{H}^+$ . Este aumento de  $\text{H}^+$  desplaza el equilibrio lactato-piruvato hacia la formación de lactato, originándose un incremento del cociente lactato/piruvato (L/P) por encima del valor considerado como normal (10:1)<sup>72,75</sup>.



**Fig I-1. Metabolismo glucídico en la sepsis.** Relación entre la glucólisis, la fosforilación oxidativa y el transporte de ATP de la mitocondria al citoplasma: La hipoxia celular potencia la vía glucolítica junto con la hidrólisis de ATP, lo que implica incremento de  $H^+$  que favorece la formación de lactato.

Por todo ello, la concentración elevada de lactato en sangre se ha utilizado con frecuencia como indicador de isquemia celular. Sin embargo, el lactato no parece ser un marcador específico de hipoxia. Durante la sepsis, se han hallado incrementos en las concentraciones de piruvato de forma concomitante a las de lactato, lo que origina una relación L/P invariable<sup>76,77</sup>. Esto contrasta con la existencia de hipoxia e implica que existen otros procesos desencadenantes de la formación de lactato en presencia de oxígeno.

En efecto, es conocido que la célula es capaz de producir lactato por determinados mecanismos aún cuando el aporte de oxígeno es el adecuado. En el desarrollo del proceso séptico parecen tener lugar algunos de estos procesos:

### 1-Incremento de la expresión de la forma inactiva de piruvatodeshidrogenasa (PDH).

Se han encontrado incrementos importantes de la forma inactiva de PDH en procesos de inducción de sepsis (ver figura I-1)<sup>78,79,80</sup>. Esto implica limitación en la oxidación de glucosa por déficit en la metabolización de piruvato. Sin embargo, la administración de dicloroacetato, un promotor de la forma activa de PDH, conlleva tan



solo una reversión parcial de la acidosis láctica que tiene lugar en los procesos sépticos, lo que sugiere la existencia de otra regulación adicional<sup>81</sup>.

## 2-Degradación proteica.

Durante la sepsis se produce un importante recambio proteico incrementando la formación de piruvato. El piruvato generado puede ser transformado en lactato sin que exista cambio en la relación L/P<sup>82</sup>. Es muy probable que la degradación proteica sea responsable de una fracción considerable de la generación de lactato durante la sepsis. De hecho, las células del músculo esquelético, donde fundamentalmente se produce la degradación proteica, contribuyen en un 40% al metabolismo global del lactato<sup>83</sup>.

## 3-Actividad del enzima sodio,potasio-adenosíntrifosfatasa ( Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- ATP-asa)

Todavía hay un gran desconocimiento acerca de la relación existente entre la glucólisis aerobia y el transporte sodio-potasio. El descenso del potencial de membrana durante la sepsis ha sido descrito en numerosos modelos sépticos<sup>84, 85, 86</sup>. Este fallo en el potencial de membrana parece relacionarse con la producción muscular de lactato<sup>87</sup>. Es posible que el incremento de la actividad Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP-asa<sup>88</sup> que se observa en la sepsis esté relacionado con alteraciones electrolíticas que aumentan el consumo de ATP y potencian la vía glucolítica con el consiguiente aumento de la producción de lactato<sup>83,89,90</sup>.

Existen otros factores como el descenso del aclaramiento de lactato que podrían contribuir al incremento de su concentración plasmática. Esta circunstancia puede producirse en algunos enfermos críticos con disfunciones hepáticas o renales. Sin embargo, exceptuando estos casos, durante la sepsis se produce un incremento del aclaramiento plasmático de lactato, tanto por oxidación como por la formación de glucosa en el hígado (ciclo de Cori)<sup>91</sup>.

Otro mediador que parece estar relacionado con el metabolismo glucídico de la sepsis es el óxido nítrico. Se ha implicado al NO en la inhibición de la respiración

mitocondrial<sup>92</sup> mediante bloqueo de enzimas que contienen hierro en su estructura como aconitasa, NADPH: ubiquinona-oxidoreductasa y succinato: ubiquinona-óxido-reductasa. Adicionalmente, el NO es capaz de inhibir el enzima glucolítico gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa por ADP-ribosilación o por S-nitrosilación del sitio activo -tiol<sup>93,94</sup>. La inhibición de la glucolisis, la cadena respiratoria y el ciclo del ácido tricarbóxico deterioran los mecanismos de aporte energético celular contribuyendo a la acción citotóxica del NO.

Estos hechos ponen de manifiesto que durante la sepsis es posible la producción de lactato sin que necesariamente implique hipoxia tisular. Por ello, es importante tener en cuenta las siguientes consideraciones para la valoración de la hiperlactatemia séptica:

- El incremento de lactato como indicador de hipoxia celular carece de especificidad. En numerosos estudios se ha comprobado que aumenta el nivel de lactato en ausencia de otros signos de hipoxia tisular<sup>72</sup>.
- No es un parámetro muy sensible, puesto que una importante proporción de pacientes sépticos con signos de shock circulatorio no presentan incrementos de lactato por encima de la normalidad<sup>25</sup>.
- La hiperlactatemia debe ser valorada junto con otros parámetros como el descenso del pH arterial y del bicarbonato plasmático; pudiendo ser útiles para detectar situaciones de inadecuada resucitación o hipoxia tisular.

### 3.2) **ALTERACIONES en el METABOLISMO PROTEICO**

Una característica propia del metabolismo séptico es una intensa aceleración de la proteólisis que conduce a un estado de pérdida de masa muscular<sup>95</sup>. Este estado catabólico produce un balance de nitrógeno negativo<sup>96</sup>. Se incrementa la formación de urea, al igual que la creatinina, ácido úrico y amonio, apareciendo todos ellos en concentraciones elevadas en orina por exceso de eliminación. La síntesis de moléculas transportadoras tales como la albúmina o la transferrina se reduce durante la sepsis y se potencia la síntesis de proteínas reactantes de fase aguda. La determinación de los niveles plasmáticos de IGF-I ("insulin-like growth factor 1") y proteínas séricas se ha

utilizado como marcadores útiles en el seguimiento del estado nutricional del paciente séptico; sin embargo, existe controversia sobre si dichos parámetros son realmente indicativos de los cambios producidos en los depósitos corporales proteicos, fundamentalmente musculares, en el estado séptico<sup>97</sup>.

### 3.3) **METABOLISMO LIPÍDICO**

Los lípidos son el principal sustrato energético durante el proceso séptico<sup>96</sup>. La sepsis implica un importante gasto energético que conduce a un estado catabólico caracterizado por hipertrigliceridemia y potenciación de la  $\beta$ -oxidación lipídica<sup>98</sup>. El proceso de movilización de grasas predomina sobre el de oxidación<sup>99</sup> lo que implica un recambio importante, que no se explica en su totalidad por el estímulo hormonal sino que sugiere la influencia de otros factores.

#### **Factores que influyen en el metabolismo lipídico de la sepsis**

- Acción de mediadores celulares.
- Estímulo hormonal.
- Efectos de los cambios de flujo sobre el tejido adiposo.
- Efecto lipolítico del descenso de las concentraciones de cuerpos cetónicos en plasma

La endotoxina es capaz de inducir mediadores como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y otras citoquinas que incrementan la lipólisis directamente y además, estimula la liberación de hormonas como adrenalina<sup>100</sup>, noradrenalina<sup>101</sup> y cortisol<sup>102</sup> con efecto lipolítico directo; además la adrenalina es capaz también de incrementar el flujo en el tejido adiposo<sup>103</sup>. Adicionalmente, de un modo indirecto la sepsis estimula la lipólisis por descenso de los niveles plasmáticos de cuerpos cetónicos<sup>104</sup>. Este importante proceso de movilización supone un incremento de los ácidos grasos libres (AGL)<sup>99</sup>.

La liberación de AGL del tejido adiposo aporta el sustrato metabólico energético necesario. La regulación de su homeostasia se realiza a través del control de la lipólisis y de la vascularización del tejido adiposo. En algunos modelos de shock animal, donde el estímulo es muy potente, pueden observarse niveles bajos de AGL asociados a una

baja oxidación por perfusión tisular insuficiente<sup>105</sup>, y a un incremento del metabolismo anaerobio que es capaz de suprimir la lipólisis<sup>106</sup>.

La hipertrigliceridemia de la sepsis parece deberse a la combinación del incremento de la producción hepática de triacilglicerol (TAG) y la disminución del aclaramiento de la fracción lipídica VLDL por parte de los tejidos periféricos. La hipertrigliceridemia, además de aportar un sustrato energético importante<sup>107</sup> parece formar parte de una respuesta protectora. Se sabe que las lipoproteínas son capaces de unirse a la endotoxina y formar complejos relativamente estables<sup>108</sup>, concretamente la endotoxina puede llegar a formar parte integral de la fracción VLDL<sup>109</sup>.

#### 3.4) **pH INTRAMUCOSO (pH<sub>i</sub>):** Indicador bioquímico de hipoperfusión

En la actualidad, se trabaja en el hallazgo de parámetros clínicamente aplicables que sean indicativos del deterioro de oxigenación tisular inducido por la sepsis, ya que el lactato a pesar de su extendido uso en la clínica diaria, no parece ser un marcador específico de hipoxia tisular. Las medidas del gasto cardiaco (GC), la saturación arterial de oxígeno (SaO<sub>2</sub>) y de sangre venosa-mixta (SvO<sub>2</sub>) han hecho posible el cálculo de parámetros como la demanda sistémica de oxígeno (DO<sub>2</sub>), el consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>) y el ratio de extracción de oxígeno.

$$\begin{aligned} DO_2 &= GC \cdot SaO_2 \\ VO_2 &= GC \cdot (SaO_2 - SvO_2) \end{aligned}$$

Sin embargo, la interpretación de estos parámetros ha resultado ser más dificultosa de lo esperado. Esta circunstancia ha forzado el desarrollo de nuevas técnicas de monitorización que permitan medir cambios bioenergéticos regionales. De los nuevos procedimientos surgidos, la tonometría aparece como un sistema viable que nos permite obtener un parámetro bioquímico válido en la monitorización de pacientes críticos.

La tonometría se fundamenta en la equiparación de presiones parciales que tiene lugar entre un fluido, como la sangre o el suero salino, y un gas de composición conocida. Este principio se aplica al equilibrio de las presiones parciales entre dos fluidos de composición diferente separados por una membrana semipermeable por lo

que después de un tiempo de equilibrio, la presión parcial será similar en ambos fluidos. La tonometría gástrica está basada en este principio según el cual la  $p\text{CO}_2$  del fluido luminal alcanza un equilibrio con la  $p\text{CO}_2$  de la mucosa. En 1982, Fiddian-Green<sup>110</sup> y colaboradores avanzaron la noción de que el pH intramucoso podía ser calculado asumiendo dos principios:

1. La  $p\text{CO}_2$  medida en el fluido del tonómetro se aproxima a la  $p\text{CO}_2$  intramucosa. Esta condición lleva implícito que el  $\text{CO}_2$  difunde libremente en el tejido y que por lo tanto el fluido luminal está en equilibrio con la  $p\text{CO}_2$  intramucosa.
2. La concentración de  $\text{HCO}_3^-$  de la sangre arterial es similar a la de la mucosa.

Aplicando la ecuación de Henderson-Hasselbalch con los valores del  $\text{HCO}_3^-$  arterial y  $p\text{CO}_2$  del contenido luminal podemos calcular el  $\text{pH}_i$ :

$$\text{pH}_i = 6,1 + \log \frac{\text{HCO}_3^- (\text{arterial})}{\alpha \cdot p\text{CO}_2}$$

[Donde  $\alpha$  representa la solubilidad de  $\text{CO}_2$  en plasma ( $\alpha=0,03$ )].

Grum y colaboradores<sup>111</sup> extendieron este concepto permitiendo el desarrollo del tonómetro actual. Estos autores midieron la  $p\text{CO}_2$  luminal con un pequeño balón fabricado con politetrafluoroetileno, material permeable a  $\text{O}_2$  y a  $\text{CO}_2$  lleno de fluido. El balón se une a un catéter fino que permite retirar el líquido después de un periodo de equilibrio.

Para la valoración de este parámetro es importante tener en cuenta sus posibles limitaciones. La premisa del establecimiento de un equilibrio entre la  $p\text{CO}_2$  del fluido luminal y la mucosa parece tener un fundamento firme<sup>112</sup>. Sin embargo, el supuesto de igualdad entre el  $\text{HCO}_3^-$  arterial y el intramucoso es cuestionable. Antonsson<sup>113</sup> realizó un estudio comparativo de las medidas de  $\text{pH}_i$  mediante tonometría y microelectrodos de vidrio en animales control y en animales con sepsis inducida con endotoxina de *E coli*. Hallaron una perfecta correlación entre ambos métodos en las 3 primeras horas del transcurso de la sepsis. Sin embargo, en un periodo de oclusión de 60 minutos existían diferencias significativas ya que el tonómetro estima valores del  $\text{pH}_i$  superiores a los

medidos con microelectrodos. La explicación más verosímil es que el  $\text{HCO}_3^-$  arterial sobreestime el  $\text{HCO}_3^-$  de la mucosa durante la oclusión mesentérica, puesto que el  $\text{HCO}_3^-$  disminuye al actuar tamponando el exceso de  $\text{H}^+$  generado por las células isquémicas. Este posible artefacto de la estimación del pHi no debe ser considerado en nuestro estudio ya que el fenómeno de oclusión raramente ocurre en pacientes críticos y no ha tenido lugar en el desarrollo de este experimento.

Como se ha mostrado anteriormente, los parámetros obtenidos a partir de la tonometría gástrica están sometidos a la influencia de varios factores que deben ser considerados para su interpretación clínica.

---

### **Posibles influencias fisiológicas sobre la tonometría intestinal**

---

$\sqrt{\text{pHi}}$	- Pérdida del equilibrio entre el $\text{HCO}_3^-$ arterial y el luminal. - Anormalidades ácido-base sistémicas remotas .
$\sqrt{\text{pCO}_{2i}}$	- $\text{pCO}_2$ arterial sistémica.
$\sqrt{\text{pCO}_{2i} - \text{pCO}_{2A}}$	- Descenso del aclaramiento de $\text{CO}_2$ en la sangre (estancamiento de flujo). - Incremento de la producción de $\text{CO}_2$ por metabolismo anaerobio. - Descenso de la producción de $\text{CO}_2$ por debajo de la demanda crítica de oxígeno.

---

$\text{pCO}_{2i} = \text{pCO}_2$  intraluminal;  $\text{pCO}_{2A} = \text{pCO}_2$  arterial

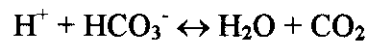
### **Significado del incremento de $\text{pCO}_2$ tisular**

En el cálculo del pHi se ha asumido que el  $\text{HCO}_3^-$  tisular de la mucosa gástrica está en equilibrio con el  $\text{HCO}_3^-$  arterial sistémico. Esta premisa no siempre es correcta debido a la influencia de la disminución de los flujos regionales que tiene lugar en el shock séptico. Además, influyen la existencia de otras anormalidades metabólicas remotas como alcalosis o acidosis sistémicas que influyen en el  $\text{HCO}_3^-$  arterial induciendo error en la estimación del pHi.

Por este motivo, parece más exacto valorar la  $\text{pCO}_2$  intramucosa ya que no se asume un equilibrio entre el  $\text{HCO}_3^-$  arterial y el de la mucosa; además, ésta no es

modificada por alteraciones ácido-base remotas. Sin embargo, la  $p\text{CO}_2$  intramucosa sí está afectada por la  $p\text{CO}_2$  sistémica. En enfermos críticos es frecuente que la  $p\text{CO}_2$  arterial sufra cambios considerables, por lo que es conveniente corregir estas variaciones mediante el cálculo de la diferencia ( $p\text{CO}_{2i} - p\text{CO}_{2A}$ ). Esta diferencia es el parámetro más recomendado, aunque desafortunadamente tampoco es un marcador idóneo de hipoxia tisular<sup>114</sup>.

Durante la hipoxia se produce un incremento del metabolismo oxidativo de tal forma que el consumo de oxígeno para generar ATP implica la producción de  $\text{CO}_2$ . Durante la hipoxia también se incrementa la producción tisular de  $\text{CO}_2$  por el exceso de  $\text{H}^+$  :



Normalmente, el  $\text{CO}_2$  generado a nivel celular difunde libremente al intersticio y éste a su vez al espacio vascular donde es transportado hacia los pulmones para ser eliminado por ventilación (ver fig I-2).

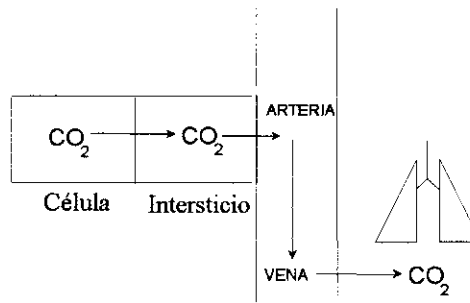


Fig I-2: Transporte de  $\text{CO}_2$

Además de las causas metabólicas anteriormente mencionadas que originan el incremento tisular de  $p\text{CO}_2$  ; éste puede aumentar por el empeoramiento del recambio circulatorio tisular provocado por la respuesta vasoconstrictora de la sepsis. Es decir, el incremento de  $p\text{CO}_2$  tisular puede ser consecuencia al menos parcialmente del deterioro en el aclaramiento del  $\text{CO}_2$ . Este es el argumento del estudio de Wei y colaboradores<sup>115,116</sup> que hallaron incrementos de  $p\text{CO}_2$  venoso y descenso del pH venoso durante resucitación cardiaca lo que sugiere que estos cambios pueden ser el resultado de alteraciones respiratorias más que metabólicas. Posteriormente, estos mismos autores han señalado en otro estudio, que a pesar de la influencia del flujo, la

disoxia intestinal séptica se relaciona más intensamente con la tasa metabólica que con el descenso del flujo esplácnico<sup>117</sup>.

Schlichtig and Bowles<sup>118</sup> abordaron el problema de la influencia del flujo en un estudio en el que sometieron a perros a descensos progresivos de flujo intestinal midiendo pHi, DO<sub>2</sub> intestinal, VO<sub>2</sub> y diferencias arteriovenosas en el pH y pCO<sub>2</sub> sanguíneo. La DO<sub>2</sub> crítica, definida como la DO<sub>2</sub> mínima capaz de sostener el metabolismo aerobio, coincide con el descenso de pHi. Además, el incremento de pH arteriovenoso por incremento en el log (pCO<sub>2</sub>)<sub>A-V</sub> (arterial-venoso) fué significativamente mayor para valores DO<sub>2</sub> por debajo del DO<sub>2</sub> crítico, lo que implica que descensos en el pHi durante la reducción progresiva del flujo están asociados con el establecimiento de acidosis metabólica. Conclusiones similares fueron reportadas por Zang y Vincent<sup>119</sup>.

La cuestión interpretativa que se plantea es: ¿qué valor debe tomar la diferencia (pCO<sub>2i</sub> - pCO<sub>2A</sub>) para que sea indicativa de acidosis metabólica y no simplemente del estancamiento del CO<sub>2</sub> producido por fosforilación oxidativa como consecuencia del descenso del flujo?. Nuevamente, Schlichtig and Bowles<sup>120</sup> hallaron que en animales normales con estancamiento de flujo, la diferencia alcanzaba valores de 25-35mmHg mientras que se superaban dichas cifras en los casos de generación anaerobia de CO<sub>2</sub>.

Uno de los objetivos del presente estudio es valorar ampliamente este parámetro en un modelo experimental. Para ello, se obtienen medidas de parámetros indicadores del estado metabólico como el pH arterial, lactato sistémico etc. y simultáneamente pCO<sub>2</sub> intramucosa. A diferencia de los estudios realizados hasta ahora, vamos a medir el pCO<sub>2</sub> intraluminal en dos segmentos diferentes del intestino delgado. Nos basamos en la hipótesis de que si dichos segmentos poseen en situación de normalidad un grado de vascularización diferente, es posible que la hipoxia no les afecte por igual y por lo tanto la pCO<sub>2</sub> intraluminal se comporte de distinto modo.

La valoración de la pCO<sub>2</sub> tisular se ha focalizado en el estudio del intestino por varias razones:

- El importante efecto de las alteraciones sépticas en la microcirculación sobre el desarrollo de hipoxia intestinal. Se ha comprobado que el mantenimiento del



flujo intestinal durante la endotoxemia previene el descenso de pHi. Sin embargo, este hecho no necesariamente indica que el descenso del pHi obtenido por tonometría gástrica siempre indique hipoxia tisular.

- El intestino posee una  $DO_2$  crítica superior al resto de los órganos vitales.
- La isquemia intestinal incrementa la permeabilidad intestinal, potencia la translocación bacteriana y puede incrementar la síntesis y liberación de citoquinas en el hígado y en las células mononucleares sistémicas.

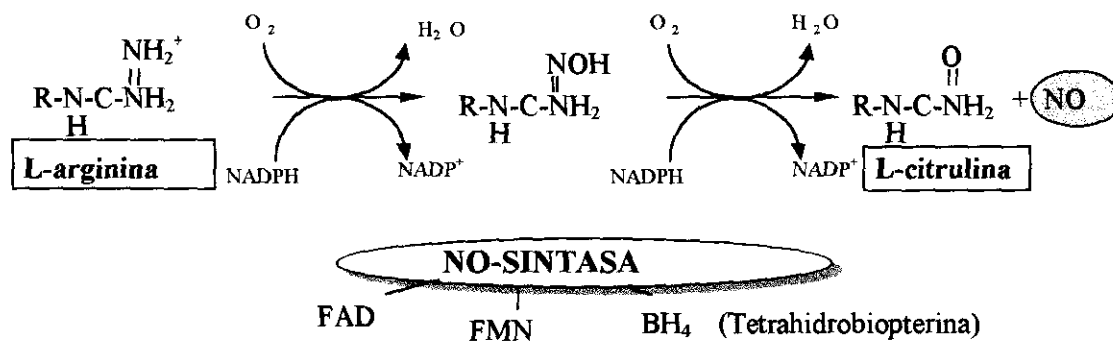
En los apartados vistos hasta ahora se ha descrito la patología séptica, desde el punto de vista hemodinámico y bioquímico, ya que estos aspectos van a ser objeto de nuestro estudio. Sin embargo, el eje central de esta tesis es la función del NO en dichos cambios y la repercusión que puede tener su interacción con otras moléculas biológicas, por lo que a continuación se describen todos los aspectos relacionados.

#### 4) ÓXIDO NÍTRICO

Furchgott y Zawadzki descubrieron en 1980 que el endotelio liberaba una sustancia capaz de producir relajación en respuesta a la acetilcolina, a la que asignaron el término de “factor de relajación endotelial” (EDRF)<sup>121</sup>. Posteriormente se realizaron estudios in vitro que pusieron de manifiesto que el EDRF posee propiedades fisicoquímicas y biológicas relacionadas con la molécula de NO<sup>122,123,124</sup>. No obstante, el paso más importante en la identificación, lo dió Palmer y colaboradores, quienes confirmaron que las células endoteliales en cultivo liberaban NO al ser estimuladas por bradicinina<sup>125</sup>. Ambos agentes parecen causar relajación equipotente de la musculatura lisa vascular<sup>125,121,126</sup>, inhiben la agregación plaquetaria y activan la guanilato ciclasa<sup>127,126</sup>. Al menos, dos grupos han hallado que poseen  $t_{1/2}$  idénticas<sup>125,126</sup>. Quizá la característica más diferenciadora de esta molécula sea que ejerce sus funciones biológicas en virtud de su reactividad química, lo que se opone a las clásicas interacciones “no-covalentes” de mediadores biológicos con sus receptores<sup>128</sup>.

#### 4.1- BIOSÍNTESIS del ÓXIDO NÍTRICO

El enzima óxido nítrico-sintasa (NOS) cataliza la conversión de L-arginina a citrulina y NO (Ver Fig I-3). Este enzima pertenece a la familia de las enzimas del citocromo P<sub>450</sub> aunque requiere una serie de cofactores diferentes: flavin adenin dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN), tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), todos ellos juegan un papel importante en la transferencia de electrones desde el sustrato NADPH al complejo hemo que es el sitio activo del enzima. El grupo tiol reducido (-SH) juega un importante papel en el mantenimiento de la actividad del enzima. Esta síntesis precisa oxígeno y NADPH.



**Fig I-3: Síntesis de óxido nítrico.** El enzima NO-sintasa cataliza la transformación de L-arginina en L-citrulina + NO.

Este enzima existe en tres isoformas diferentes que se codifican a partir de tres genes diferentes:

- NOS neuronal: **tipo I\*** (nNOS)
- NOS inducible: **tipo II** (iNOS)
- NOS endotelial: **tipo III\*** (eNOS)

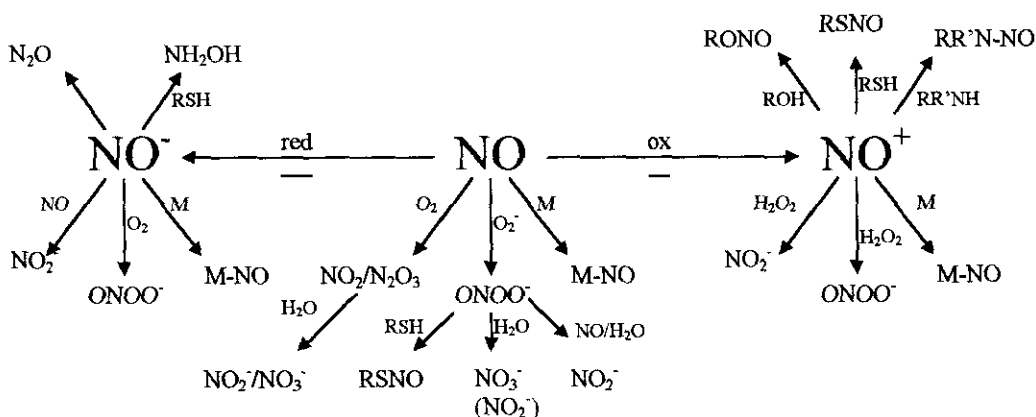
(\*)NOS neuronal (tipo I, nNOS) y la isoforma endotelial (tipo III, eNOS) son isoenzimas  $\text{Ca}^{++}$  y calmodulin-dependientes. Hasta ahora, estas dos enzimas habían sido consideradas como enzimas constitutivas, mientras que el enzima  $\text{Ca}^{++}$  independiente se conocía como NOS inducible. Posteriormente, se ha visto que la inducción o no del enzima no depende del isoenzima sino del tipo de estímulo. Las isoenzimas tipo I y III son activas en condiciones fisiológicas. Están presentes intracelularmente y se activan mediante flujos de  $\text{Ca}^{++}$  intracelulares, son productoras de pequeñas cantidades de NO.

La **iNOS (tipo II)** no se expresa en condiciones fisiológicas de normalidad. Se induce en la inflamación por acción de citoquinas, endotoxina etc. Produce grandes cantidades de NO y de forma más prolongada. iNOS (tipo II) se puede producir en diferentes tipos celulares como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, células de la musculatura lisa vascular y condrocitos. La inducción de iNOS requiere la síntesis *de novo* de proteína.

Recientemente se ha puesto de manifiesto que existe una vía alternativa no enzimática para la síntesis de NO. Esta nueva vía de síntesis parece estar relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno<sup>129</sup>.

#### 4.2 - REACTIVIDAD

El NO reacciona en sistemas biológicos con oxígeno molecular ( $O_2$ ), superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), y metales de transición ( $M$ )<sup>128</sup>. Los productos de estas reacciones son otros óxidos de nitrógeno ( $NO_2$ ), peroxinitrito ( $OONO^{\bullet}$ ) y aductos nitrosilo con metales de transición ( $M-NO$ ). Las condiciones fisiológicas influirán en el predominio de cada una de estas vías y de ello dependerá el efecto protector o perjudicial que pueda ejercer el NO.



**Fig I-4: Reactividad del NO.** El NO puede sufrir procesos de reducción y oxidación e interactuar con metales de transición (M) y otras especies químicas.

- Las reacciones que tienen lugar con metales de transición condicionan la actividad biológica del NO, ya que a través de éstas, el NO interacciona con diversas proteínas. La interacción con el grupo hemo de la guanilatociclasa soluble es un ejemplo de

este tipo de interacción que conlleva la inducción del enzima <sup>IGNARRO 89,131</sup>. La hemoglobina inhibe esta activación, del mismo modo que impide la formación de cualquier complejo hierro-nitrosilo intracelular<sup>132</sup>.

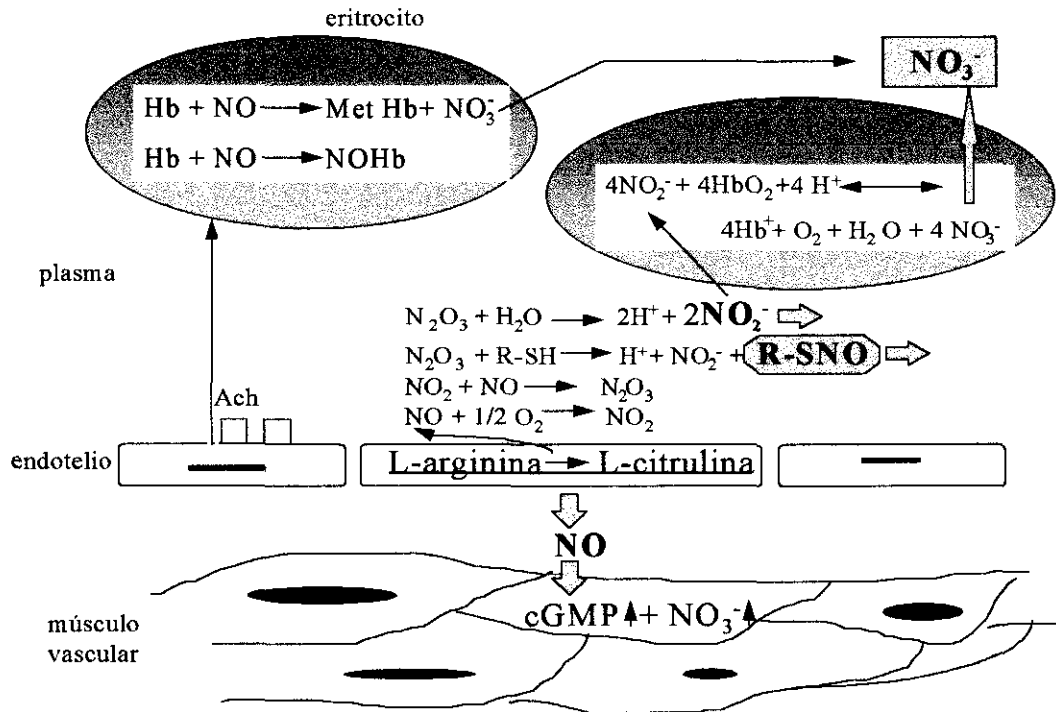
En general, las reacciones del NO con O<sub>2</sub> están asociadas con su citotoxicidad. La implicación de OONO<sup>-</sup> y dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) en diversos tejidos ha sido ampliamente descrita<sup>133,134,135</sup>. Pero además de su poder citotóxico, el OONO<sup>-</sup> parece estar involucrado en ciertos mecanismos biológicos, ya que al igual que los nitritos, participan en reacciones de transnitrosilación (transferencia de grupos NO<sup>+</sup>) especialmente con grupos tiol originándose RSNOs. Se ha sugerido que los peroxinitritos inducen relajación tiol-dependiente de musculatura lisa vascular<sup>136</sup> e inhiben la agregación plaquetaria<sup>137</sup>. Recientemente, Beckman y sus colaboradores han aislado un anticuerpo para la detección de nitrotirosina, un producto minoritario pero estable de la reacción de peroxinitritos con proteínas<sup>138</sup>.

#### 4.3- METABOLISMO del NO

El NO sintetizado, rápidamente difunde a las células de la musculatura lisa vascular y al plasma donde puede reaccionar siguiendo diferentes rutas:

- Plasma:
  1. Conversión a nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), y
  2. S-nitrosotioles. Son los compuestos resultantes de la interacción del NO con grupos tiol (-SH) generalmente proteicos.
- Eritrocito:
  1. El NO puede atravesar la membrana eritrocitaria e interaccionar con hemoglobina, para formar metahemoglobina (metHb) y nitratos. Después de un periodo de varias horas los nitritos se oxidan en los eritrocitos y son excretados en la orina como nitratos. Esta interacción puede predominar en los capilares, donde la distancia entre las células endoteliales y los glóbulos rojos es más pequeña ya que el NO derivado del endotelio tiene que difundir a los eritrocitos localizados en el centro del vaso.

2. Reacciona con los grupos  $-SH$  de la Hb para formar nitrosohemoglobina (NOHb).



**Fig 1-3: Metabolismo del NO:** En el plasma interacciona con una serie de moléculas desembocando en la formación de nitritos y RSNO's. En el hematíe puede interaccionar con la Hb generando metHb + nitratos, o bien formar NO-Hb. Ach = acetilcolina..

El que se predomine una vía metabólica u otra depende fundamentalmente de:

- Las diferentes proporciones de  $NO/NO_2^-$  que difunden a través de la membrana del eritrocito.
- El estado de saturación de oxígeno de la Hb (deoxiHb versus oxiHb ).
- Ambiente redox de la circulación.

A la vista de las diferentes interacciones y reacciones que sufre el NO en el organismo la medida de nitratos y nitritos junto con la determinación de nitrosotioles pueden ser útiles en la monitorización del NO derivado del endotelio. Ambos compuestos se hallan en plasma, lo que evita métodos invasivos que requieren tejido y por ello menos aplicables en el seguimiento clínico habitual de un paciente séptico. Los nitratos son los productos finales más estables pero son poco específicos de la producción de NO, mientras que los nitritos y los nitrosotioles son más inestables pero más específicos<sup>139</sup>.

## 5. FUNCION del "NO" en los CAMBIOS INDUCIDOS por la SEPSIS

Una vez conocida la naturaleza química del NO y cómo interacciona con otras sustancias biológicas, vamos a analizar su actividad como molécula que juega un importante papel como mediador de las alteraciones vasculares y celulares en el shock séptico. En la sepsis existe una hiperproducción de NO que parece ser el resultado de la combinación de varias fuentes: células vasculares, monocitos de sangre periférica, macrófagos alveolares, células de Kupffer, neutrófilos etc.; todos ellos estimulados por la respuesta inmunológica desencadenada por la sepsis<sup>140</sup>. Esta hiperproducción de NO tiene consecuencias que se reflejan en la célula y en la función vascular del siguiente modo:

### 5.1- El NO en el METABOLISMO OXIDATIVO y DAÑO CELULAR SÉPTICO

La respuesta inflamatoria séptica produce un stress severo sobre los tejidos que puede tener serias implicaciones en el mantenimiento del metabolismo oxidativo intracelular. La sepsis provoca una elevada demanda energética que conlleva la aceleración del metabolismo oxidativo. El metabolismo oxidativo es el resultado del consumo aerobio de oxígeno durante la oxidación de los sustratos para proveer energéticamente a la célula en forma de ATP. El oxígeno consumido por la mitocondria, genera de forma simultánea especies reactivas de oxígeno (ERO), principalmente en células inflamatorias. Este proceso oxidativo que no produce energía parece acelerarse durante la sepsis generándose  $O_2^-$ , peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $OH^*$ ) y otras especies cuyos efectos oxidantes contribuyen a la muerte celular. La terapia con oxígeno puede ser una fuente importante de producción de radicales libres<sup>141</sup>. Además del desencadenamiento de la respuesta humoral, la formación de ERO se ha implicado en el daño tisular relacionado con fenómenos de isquemia-reperusión<sup>142</sup>. Este fenómeno puede tener lugar en la sepsis debido a la disregulación circulatoria.

La toxicidad de las sustancias resultantes de la reacción del NO con ERO no está perfectamente establecida pero parece depender de la naturaleza del estímulo:

- En los sistemas donde la toxicidad es originada predominantemente por ERO, el NO puede actuar inhibiendo la acción de las ERO y por lo tanto limitando el daño. El NO es capaz de inactivar ciertos radicales libres y prevenir el daño celular asociado a  $H_2O_2$ <sup>143,144</sup>.
- Sin embargo, en aquellos donde la toxicidad se produce por la biosíntesis de NO, las reacciones de éste con ERO pueden ser perjudiciales pues potencian la vulnerabilidad a reacciones de nitrosilación y oxidación que afectan a la función mitocondrial con el consiguiente deplecionamiento de los depósitos energéticos y disfunción celular<sup>145</sup>.

Durante la sepsis, el stress oxidativo supera la respuesta antioxidante generada como defensa, lo que favorece el fallo orgánico por lesión tisular oxidativa. La producción de ERO junto con la de NO, induce el deterioro del control vascular y empeoramiento de la actividad enzimática.

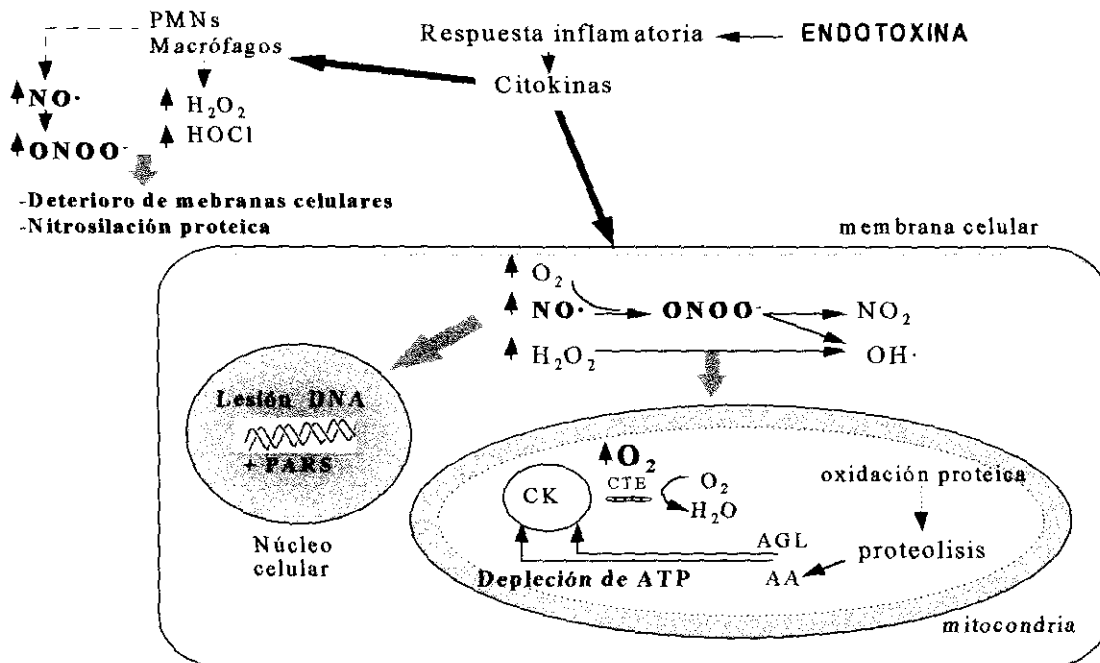
#### ⇒ STRESS OXIDATIVO EXTRACELULAR

Los lipopolisacáridos bacterianos desencadenan una respuesta humoral caracterizada por activación de leucocitos y células endoteliales, lo que conlleva *marginación leucocitaria y liberación de citoquinas como el TNF- $\alpha$  e interleuquinas*. Este hecho puede implicar entre otras alteraciones la inducción de la síntesis de NO e incremento de la producción de ERO. Esta liberación de productos secretores y la generación de ERO junto con la liberación de proteasas y otras enzimas degradativas, perjudican los componentes estructurales de la célula<sup>146,147</sup>, deterioran la integridad del endotelio capilar y favorecen la formación de edema<sup>148</sup>.

#### ⇒ STRESS OXIDATIVO INTRACELULAR

La respuesta inflamatoria séptica genera un stress severo sobre los tejidos que puede tener serias implicaciones en el mantenimiento del metabolismo oxidativo intracelular. La demanda metabólica creada por la sepsis provoca que la mitocondria genere en exceso radicales derivados de oxígeno junto con otros mediadores como mieloperoxidasa, proteasas etc. capaces todos ellos de lesionar las membranas celulares<sup>141</sup>. Debido a la gran reactividad de los radicales generados, especialmente

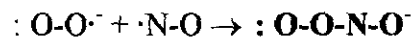
$\text{OH}^\bullet$ , se puede producir daño específico lipídico, lesión en el DNA y en los componentes proteicos de las diversas estructuras celulares. Contribuye también a este daño el potente efecto oxidativo del  $\text{ONOO}^-$ , metabolito reactivo del NO. Asimismo, la terapia con oxígeno puede ser una fuente adicional de producción de radicales libres y  $\text{ERO}^{141}$ .



**Fig 1-5: Relación del NO con el stress oxidativo generado por la sepsis** El NO reacciona con el  $\text{O}_2$  formando  $\text{ONOO}^-$  responsable de lesión en el DNA y de la depleción de ATP celular. AA: aminoácidos, PMNs: leucocitos polimorfonucleares, CTE: cadena de transporte de electrones, CK: ciclo de Krebs, AGL: ácidos grasos libres en plasma, PARS: enzima nuclear poly-(ADP-ribosa)-sintetasa.

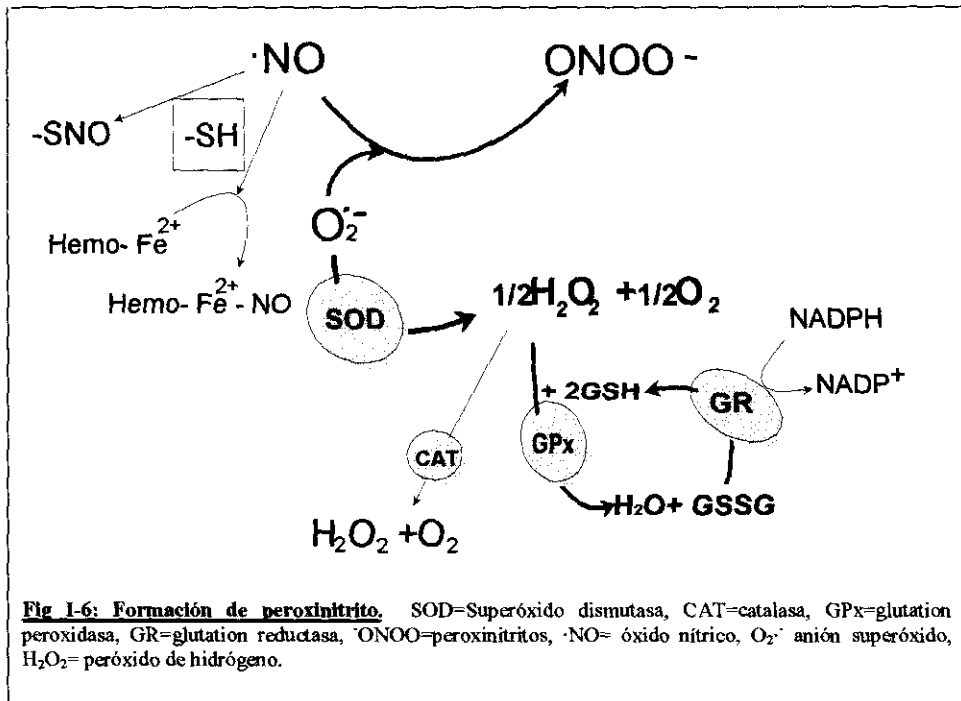
### Mecanismo de la lesión mediada por NO: peroxinitritos

El principal mecanismo de daño asociado con la producción de NO *in vivo* es su reacción con anión superóxido para formar peroxinitrito. El anión superóxido posee un electrón desapareado que rápidamente combina con NO generando peroxinitritos:



La constante de reacción entre el  $\cdot\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  es  $1,9 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ , aproximadamente tres veces superior a la velocidad de reacción del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  con la superóxido dismutasa (SOD). Esto implica que la formación de peroxinitritos constituye un importante sistema de destrucción de  $\cdot\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , radicales libres potencialmente tóxicos.





El anión peroxinitrito, a diferencia del anión superóxido y el ·NO, no es un radical libre, sin embargo su formación es termodinámicamente irreversible y su marcada estabilidad como anión a pH alcalino le confiere toxicidad<sup>149</sup> ya que le permite difundir a través de la membrana celular ejerciendo así su efecto oxidante. Es capaz de reaccionar con diversas moléculas biológicas a través de la oxidación de:

- Centros activos de hierro y grupos sulfuros<sup>150,151</sup> inactivando gran variedad de enzimas (coenzima A, gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa, ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de la membrana...) causando por lo tanto lesión celular<sup>152</sup>.
- Grupos tiol proteicos<sup>153</sup>. Igualmente oxidan sulfidrilos de bajo peso molecular como la cisteína y el glutathion deplecionándose importantes mecanismos captadores de radicales libres y ERO<sup>154</sup>.

Es capaz de generar los mismos efectos que el ataque por radical hidroxilo<sup>155,156</sup>. Sin embargo, el hecho de que captadores de OH<sup>·</sup> no reduzcan el efecto lesivo de los peroxinitritos, sugiere que su toxicidad pudiera estar relacionada con una acción oxidante directa sobre determinados componentes celulares<sup>157,153</sup>.

La reactividad y descomposición de los peroxinitritos está determinada por el ambiente químico y la cantidad relativa de éste frente al NO. Una parte importante de las reacciones que sufren los peroxinitritos están catalizadas por metales de transición incluyendo los centros metálicos de la SOD y mieloperoxidasa<sup>158,159</sup>. Los metales de transición catalizan su excisión heterolítica produciendo anión hidroxilo junto con ión nitrosonio ( $\text{NO}_2^+$ ). Este ión ataca grupos fenólicos como los residuos de tirosina formando *in vivo* 3-nitrotirosina. Esta reacción está catalizada por la SOD, el mismo enzima que podría minimizar la formación de peroxinitritos por captar superóxido<sup>160</sup>. Sin embargo, cuando se expresa el enzima iNOS en circunstancias en que la formación de superóxido está incrementada o la actividad de la SOD disminuida, se forma  $\text{ONOO}^-$  en exceso<sup>161</sup>.

La 3-nitrotirosina es una sustancia estable que permite estimar la producción de peroxinitritos y por lo tanto el daño celular asociado con el NO<sup>138</sup>. Existen otras fuentes de formación de nitrotirosina, aunque los peroxinitritos son su origen fundamental. Beckman y colaboradores han obtenido anticuerpos mono y policlonales para la detección de 3-nitrotirosina por inmunohistoquímica y Western blotting<sup>138</sup>. Este hallazgo ha permitido observar extensa formación de 3-nitrotirosina en muestras de tejido pulmonar en situaciones patológicas como sepsis, neumonía y distress respiratorio<sup>162</sup>. También los miocitos humanos muestran esta nitrosilación en la sepsis y la miocarditis<sup>163</sup>. Es posible que la depresión miocárdica séptica atribuida al NO<sup>164</sup>, se deba a la nitración de proteínas contráctiles de las células musculares. De hecho, la actina nitrosilada artificialmente con tetranitrometasona muestra una contractilidad anómala<sup>165</sup>.

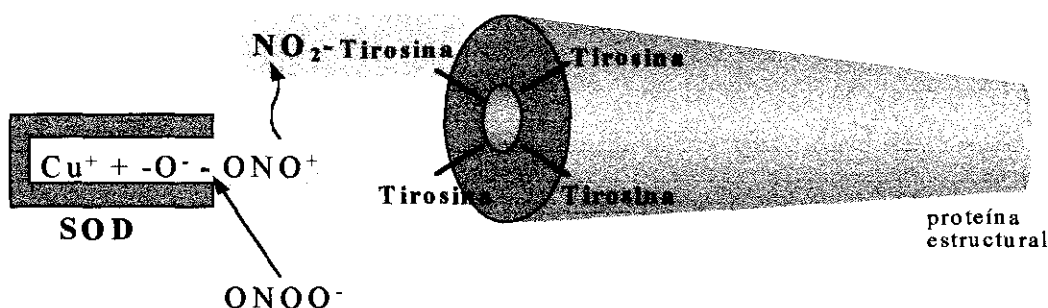


Fig I-7: Esquema del mecanismo de formación de nitrotirosina

Otro mecanismo de lesión celular atribuido a los peroxinitritos es su capacidad para romper la estructura monocatenaria del DNA con la consecuente activación del

enzima nuclear poly-(ADP-ribosa)-sintetasa (PARS). Esta activación produce ADP-ribosilación masiva de proteínas celulares deplecionando a la célula de nicotin-adenin-dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) y ATP<sup>152, 166</sup>. Este hecho contribuye a reducir los procesos activos de la célula incluida la respuesta vasoconstrictora de la musculatura lisa vascular<sup>161</sup>. La activación de la PARS, parece contribuir a la disfunción endotelial séptica ya que su inhibición con 3-aminobenzamida mejora la funcionalidad del endotelio<sup>166</sup>. Sin embargo, en arterias pulmonares los peroxinitritos no presentaban efectos sobre la relajación vascular dependiente de endotelio mediada por acetilcolina<sup>136</sup> y no parecen comprometer la capacidad de liberación de NO por parte del endotelio<sup>161</sup>. De acuerdo con estas observaciones Chabot y colaboradores postulan que los peroxinitritos causan relajación vascular por diferente mecanismo al del NO.

Todos estos efectos, revelan el papel fundamental que desempeñan los peroxinitritos en patologías de carácter inflamatorio. Por eso en nuestro trabajo hemos considerado de vital importancia el conocer en profundidad el alcance y en qué órganos se manifiesta la lesión mediada por peroxinitritos. Para ello, hemos empleado métodos inmunohistoquímicos que nos permiten detectar nitrotirosina en diversos órganos.

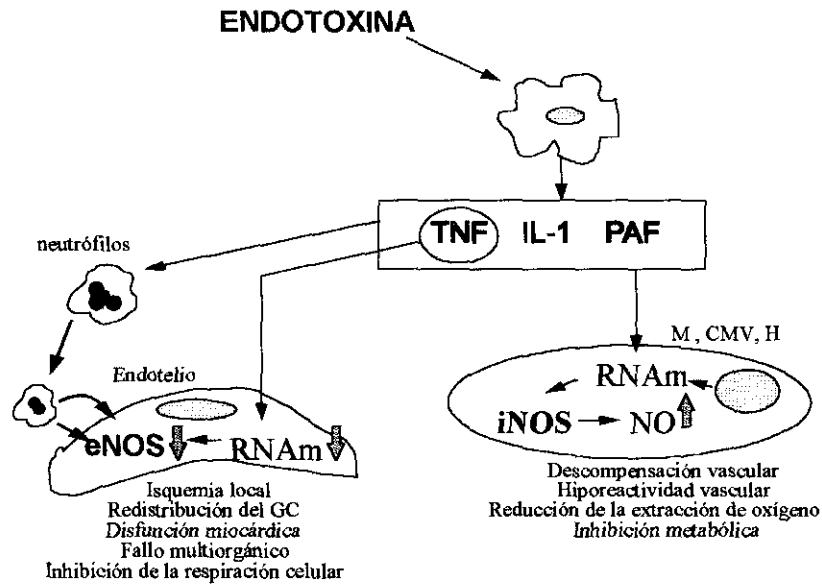
Es importante señalar, que además del daño celular mediado por la formación de radicales y sustancias oxidantes, el NO tiene efectos directos sobre el metabolismo celular<sup>167, 160, 128, 168</sup>.

## 5.2- EFECTOS HEMODINÁMICOS del NO en la SEPSIS

El cambio fisiológico predominante en todos los pacientes sépticos es la pérdida del tono vascular. Esto conlleva alteraciones en el flujo microvascular con el consiguiente desarrollo de la disfunción orgánica. Los principales determinantes del tono vascular son los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos que causan vasoconstricción, y el EDRF que causa vasorelajación. El hallazgo de que las células vasculares endoteliales producen nitritos como respuesta a la exposición de citoquinas o endotoxinas indica que el NO es un mediador fundamental en el shock séptico<sup>169</sup>.

Actualmente, no hay duda de que el NO es el principal mediador responsable de las alteraciones vasculares de la sepsis<sup>170</sup>. Las células endoteliales de aorta de oveja liberan un factor similar al NO tras un minuto de incubación con endotoxina de *Escherichia coli*<sup>171</sup>. La endotoxina<sup>172</sup> y la interleukina-1 también estimulan la liberación de NO por células musculares lisas<sup>173</sup>. El hecho de que la hipotensión producida en varios modelos de shock séptico se atenúe mediante la inhibición de la síntesis de NO, sugiere que el NO tiene un papel importante en la hipotensión producida por la sepsis<sup>174,175,176,70</sup>. Todos esos hallazgos hablan en favor de que la endotoxina y ciertas citoquinas estimulan la síntesis de NO de un origen no endotelial, posiblemente el músculo liso vascular, lo cual sería responsable de la disminución de la respuesta vasoconstrictora.

- **Actividad de la eNOS:** El shock séptico conlleva una activación inicial de la eNOS que provoca una temprana hiporeactividad vascular y la consiguiente la inducción de la iNOS en la fase más avanzada del shock. Esta activación temprana de la eNOS está mediada por la liberación de TNF- $\alpha$ , IL-1, el factor activador plaquetario (PAF)<sup>177</sup>. Estos mediadores actúan en paralelo y sinérgicamente para inducir la iNOS. A medida que la sepsis evoluciona se produce un deterioro de la relajación dependiente de endotelio, presumiblemente por reducción de la actividad de la eNOS<sup>178</sup> a través de un incremento de la degradación eNOS<sup>179</sup> y por otros mecanismos como la adhesión de neutrófilos al endotelio<sup>180</sup>.
- **Actividad de la iNOS:** Estímulos inmunológicos, como la endotoxina y la interleukina-1, son capaces de inducir la expresión de otra NOS, presente en neutrófilos, macrófagos y endotelio vascular, que tiene un papel en la defensa del huésped contra microorganismos mediante su acción citotóxica<sup>181,182,183,184</sup>. Los numerosos estudios realizados sobre la influencia de la actividad de la iNOS y el NO generado en la sepsis, revelan que esta inducción contribuye al desarrollo de la hiporeactividad vascular y al descenso de la presión arterial favoreciendo así el fallo circulatorio.



**Fig 1-8. Inducción de la producción de NO en la sepsis.** El TNF y otros mediadores inducen la síntesis de iNOS, mientras que la actividad de eNOS disminuye. M: macrófagos, CMV: células músculo vascular, H: hepatocitos.

El TNF- $\alpha$  (ver fig I-8), es un mediador inflamatorio que juega un papel central en los cambios metabólicos y hemodinámicos de la sepsis<sup>185</sup>, ya que induce la expresión de iNOS en macrófagos<sup>186</sup>. Una prueba de ello es que los macrófagos peritoneales de ratón estimulados 24 horas con endotoxina generan nitritos y nitratos<sup>181</sup>. Se ha observado que el TNF- $\alpha$  también presenta una acción vasodilatadora que es parcialmente dependiente del endotelio y que disminuye la contractilidad de anillos vasculares a agentes vasoconstrictores<sup>187</sup>. Hallazgos más recientes apoyan, que a pesar del efecto vascular directo del TNF- $\alpha$ , el NO es el responsable más importante de las alteraciones hemodinámicas de la sepsis<sup>188,43</sup>.

En estado de normalidad, el tono vascular es regulado por la interacción de mecanismos miogénicos neurogénicos y por el NO<sup>189</sup>. La liberación basal de NO por el endotelio inhibe la respuesta a estímulos vasoconstrictores. La respuesta contráctil a la estimulación eléctrica en arterias de varias especies animales aumenta cuando se elimina el endotelio<sup>189</sup>. Este efecto es abolido por la hemoglobina, sugiriendo que el NO es el mediador responsable. Asimismo, la eliminación del endotelio o la inhibición de la síntesis de NO aumenta la respuesta vascular a agentes presores<sup>190</sup>. La interacción que existe entre el sistema simpático y el NO en la sepsis no es conocida todavía, y podría explicar parcialmente las características de la respuesta vascular en la sepsis.

En resumen, el estado actual del conocimiento sobre las alteraciones hemodinámicas en la sepsis se basa en los siguientes conceptos:

- 1) En la sepsis existe una alteración de la regulación del tono vascular que se puede manifestar como una relación anormalmente lineal entre el transporte y el consumo de oxígeno.
- 2) En la sepsis clínica existe una vasodilatación sistémica y una disminución de la respuesta vasoconstrictora y vasodilatadora dependiente de endotelio.
- 3) La endotoxina aumenta la liberación de NO.
- 4) El NO disminuye la respuesta vasoconstrictora.

Recientemente se ha puesto de manifiesto que el efecto tóxico del NO sobre el endotelio puede estar relacionado con el efecto oxidante de los peroxinitritos. La evidencia de que los peroxinitritos median la patogénesis de la sepsis se muestra en el hecho de que la administración de mesoporfirina de manganeso, un análogo de la SOD y captador de peroxinitritos, atenúa aspectos de la disfunción endotelial en el shock séptico<sup>191</sup>. En vasos coronarios de rata los peroxinitritos inhiben la relajación dependiente de endotelio inducida por acetilcolina<sup>192</sup>. Sin embargo esta acción de los peroxinitritos sobre el endotelio no se confirma en todos los lechos vasculares: el pretratamiento de la arteria pulmonar con peroxinitritos potencia la respuesta a acetilcolina<sup>161</sup>.

Nuestro estudio está encaminado a examinar el papel del NO en los cambios hemodinámicos producidos por la sepsis. Para ello, se estudia en un modelo de sepsis animal los efectos producidos por la hemoglobina como molécula captadora de NO y la repercusión hemodinámica de su interacción con moléculas que contienen grupos -SH en su estructura como el glutatión.

### 5.3- **El NO y la FISIOPATOLOGÍA GASTROINTESTINAL de la SEPSIS**

El NO, además de mediar las alteraciones hemodinámicas de la sepsis actúa también a nivel celular pudiendo estar involucrado en mecanismos tanto de protección, como de lesión celular. La citotoxicidad juega un papel fundamental en el proceso

séptico ya que determina al menos en cierto grado, el desarrollo asociado del “Síndrome de fallo multiorgánico”. El estudio del efecto tisular del NO aporta resultados dependientes del modelo séptico y del tejido analizado, lo que impide obtener conclusiones globalizantes. En nuestro experimento se analiza el grado de lesión atribuible al NO mediante el análisis inmunohistoquímico de nitrotirosina en órganos cuya funcionalidad puede estar comprometida en la sepsis: hígado, intestino, riñón y pulmón. Igualmente se ha estimado el grado de afectación orgánica mediante parámetros bioquímicos.

\* **Efectos en el tracto intestinal:** Para valorar el papel biológico del NO como molécula endógena implicada en la funcionalidad intestinal hay que tener en cuenta tres aspectos fundamentales:

1. El NO como regulador potencial de la integridad de la mucosa intestinal<sup>193, 194, 195</sup>.
2. Posible efecto protector, aunque actualmente discutido, fundamentado en la capacidad del NO de neutralizar los efectos perjudiciales de radicales libres generados en procesos de stress oxidativo importante.

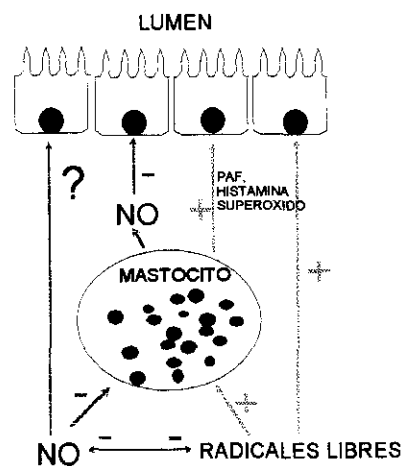


Fig I -9. En determinadas circunstancias el NO puede actuar neutralizando la acción perjudicial de los radicales libres.

3. La implicación del NO y derivados oxidantes (ONOO<sup>-</sup>) como moléculas perjudiciales en procesos de inflamación intestinal en los que puede incluirse algunos modelos sépticos.

Las referencias que existen acerca del efecto del NO sobre la mucosa en estado séptico son en ocasiones contradictorias. En modelos de sepsis animal, se ha comprobado que en la primera hora del desarrollo séptico, la inhibición de la síntesis de NO potenciaba la lesión de la mucosa<sup>196</sup>. Sin embargo, cuando la sepsis progresaba (5~h), dicha inhibición reducía de forma significativa el daño intestinal<sup>197</sup>. La explicación de esta aparente contradicción puede deberse a que en la sepsis temprana, el NO basal mantiene la perfusión de órganos adecuada y la actividad deficiente de la eNOS puede producir una mala distribución del flujo junto con estasis, adhesión leucocitaria y lesión tisular<sup>198, 199</sup>. Según lo hallado, la inhibición de la iNOS, podría tener efectos beneficiosos. De hecho la mayoría de los trabajos realizados al respecto, indican que a pesar de que la producción de NO pueda ser un mecanismo de defensa, el acúmulo progresivo de NO procedente de la iNOS, puede causar directa o indirectamente lesión tisular<sup>197, 200</sup>.

\* **Fallo hepático:** existe controversia acerca de su posible actividad hepatoprotectora o por el contrario citotóxica. La inhibición de la síntesis de NO empeora la lesión hepatocelular mediada por endotoxina<sup>201,202,203</sup>, lo que sugiere en principio un efecto hepatoprotector<sup>201,202</sup>. Sin embargo, esta acción parece depender de la selectividad del inhibidor. En un estudio comparativo de varios inhibidores de la síntesis de NO se ha puesto de manifiesto que la inhibición de la iNOS no incrementa la necrosis hepatocelular séptica, aunque la inhibición no selectiva de la NOS es extremadamente hepatotóxica<sup>204</sup>. En nuestro estudio se valorará la lesión mediada por NO a través de la determinación inmunohistoquímica de nitrotirosina. Además del efecto celular directo, otra consecuencia de la hiperproducción de NO es la disminución de la síntesis proteica hepática de un modo dependiente de la concentración por un mecanismo no relacionado con el GMPc<sup>140</sup>. Esta inhibición de la síntesis proteica ocurre sin que necesariamente se produzca muerte hepatocelular<sup>140</sup>. Por otra parte, la inhibición de la síntesis de NO, disminuye las reservas hepáticas de glutathion reducido, un componente esencial de la defensa celular antioxidante<sup>140</sup>.



### Efectos pulmonares:

Al igual que se ha comentado para otros tejidos, cada vez existen más pruebas de que el NO que se genera en el daño pulmonar agudo es perjudicial. De hecho se han llevado a cabo estudios inmunohistoquímicos que muestran que en el daño agudo pulmonar se produce una extensa formación de nitrotirosina<sup>205</sup>. Por otra parte, el NO posee una variedad de efectos antioxidantes, por lo que puede ejercer un efecto beneficioso sobre el daño agudo. Con la información disponible hasta el momento no se puede concluir con certeza si el incremento de producción de NO en los procesos inflamatorios es beneficioso o perjudicial. Sin embargo, el incremento simultáneo de NO y  $O_2^{\bullet-}$  puede conducir a la formación de peroxinitritos con el consiguiente daño tisular oxidativo<sup>205</sup>.

Concluyendo, debido a la actividad pluripotencial del NO, éste puede tener un efecto celular muy variable; como se ha expuesto, puede actuar como citoprotector hepático y paradójicamente como citotóxico intestinal en modelos sépticos de iguales características y métodos de estimación de lesión tisular idénticos<sup>206</sup>. Esta aparente selectividad tisular, puede deberse entre otras causas a la diferencia en la capacidad antioxidante de cada órgano y el distinto grado de susceptibilidad a una vascularización deficiente. Otro factor a considerar es la posibilidad de que el NO presente una reactividad dependiente de la presencia en cada tejido de moléculas como tirosina y cisteína capaces de interactuar con el NO.

## **6. S-NITROSOTIOLES**

Muchos años han pasado desde su descubrimiento y aún existe controversia acerca de la identidad química del EDRF. Aunque en principio la evidencia farmacológica y química apuntan al óxido nítrico como el verdadero EDRF, ambos no parecen presentar siempre idénticas características<sup>207</sup>. Algunos investigadores han observado que el EDRF y el NO relajan la musculatura lisa no vascular<sup>208</sup>, sin embargo, en otros estudios el EDRF no muestra esta propiedad<sup>209</sup>. Myers y colaboradores hallaron que la potencia relajante del EDRF era 80 veces superior a la del NO en un bioensayo

realizado con células endoteliales aórticas. Además, Kelm y Schrader<sup>210</sup> estimaron que la  $t_{1/2}$  del NO *in vivo* era considerablemente más corta ( $\sim 0,1$ s) que la estimada para el EDRF ( $\sim 3-30$ s) *ex vivo*<sup>126, 211</sup>. Aunque algunos de estos trabajos han sido criticados por deficiencias metodológicas, la consideración de todos estos datos conlleva a cuestionarse si la bioactividad del EDRF se debe enteramente al NO, o bien existen sustancias relacionadas que participen en esta función. Una de las clásicas especies químicas que rápidamente reaccionan con el NO en condiciones fisiológicas sin producir inactivación de éste, son los tioles biológicos originándose la formación de tionitritos o nitrosotioles. En este experimento vamos a testar la actividad biológica de la interacción del óxido nítrico con moléculas, como la Hb y el GSH, en cuya composición química están presentes los grupos tiol.

Los S-nitrosotioles son ésteres de ácido tionitroso con la siguiente estructura general: R-S-N=O. En un principio se utilizaron en síntesis orgánica como potentes agentes nitrosilantes<sup>212</sup>. Posteriormente el interés por estos compuestos ha ido incrementándose, tanto por sus potenciales propiedades farmacológicas, como por sus posibles funciones fisiológicas. La primera demostración de que estos compuestos eran biológicamente activos fue la descripción de los efectos antibacterianos de S-nitrosocisteína (CisNO)<sup>213</sup>. Más recientemente, los RSNOs han sido objeto de diversos estudios farmacológicos en los que ha puesto de manifiesto sus propiedades como potentes relajantes de músculo liso demostrándose esta actividad en una gran variedad de preparaciones de músculo liso vascular<sup>214</sup>. Parecen ejercer un papel regulador en el control de la motilidad gastrointestinal y la función de los esfínteres<sup>215</sup>. Igualmente se ha demostrado la actividad de los RSNOs como relajantes de la musculatura lisa traqueal<sup>216</sup> y parece ser que esta acción está mediada por la elevación de los niveles de  $GMP_c$  y su capacidad para activar la guanilatociclasa. Esta actividad se ha descrito para diversos tipos de RSNOs, incluyendo S-nitroso-N-acetilpenicilamina, CisNO, S-nitroso-N-acetilcisteína, S-nitroso-captopril y S-nitroso- $\beta$ -D-tioglucoza<sup>217, 218</sup>. Igualmente se ha atribuido a diferentes RSNOs actividad como antiagregantes plaquetarios<sup>218, 219</sup>. Parecen ser metabolitos activos de la nitroglicerina y vasodilatadores relacionados, lo que sugiere que posiblemente sean los mediadores responsables de su actividad relajante de la musculatura vascular<sup>220, 217</sup>. También los nitrosotioles han sido propuestos como probables causantes de la actividad antitrombótica de los nitrovasodilatadores<sup>221</sup>.

## 6.1- PRODUCCIÓN ENDÓGENA DE NITROSOTIOLES

En los sistemas biológicos, el NO rápidamente es oxidado dando lugar a  $\text{NO}^+$  y  $\text{ONOO}^-$  que reaccionan con el nucleófilo más abundante y reactivo en plasma: el grupo tiol originando la formación de RSNOs.

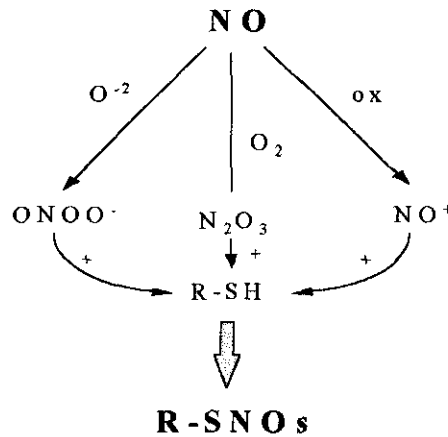


Fig I-10: Esquema de formación de RSNOs

Estas reacciones de transnitrosación pueden tener lugar con otros grupos nucleofílicos diferentes aunque en condiciones más restringidas. Por ejemplo, N-nitrosación del DNA y modificaciones covalentes de restos de tirosina, ambos mecanismos potenciales de toxicidad, es más probable que acontezcan en estado de importante stress oxidativo ya que provocan depleción de la reserva de grupos tiol<sup>145</sup>.

Recientemente se han identificado RSNO “in vivo”: en plasma humano y de ratón, en el fluido de las vías aéreas humanas, intracelularmente en neutrófilos, en plaquetas y en saliva de *Rodnius prolixus*<sup>222,223,224,225,226,227,228</sup>. En plasma humano, se han hallado concentraciones de RSNO  $\approx 7\mu\text{M}$  de los cuales, se ha estimado que el 96% son S-nitrosoproteínas fundamentalmente albúmina (82%)<sup>222</sup>. La abundancia de los RSNOs en plasma, es del orden de 3 ó 4 veces la concentración de NO libre, lo que sugiere que los RSNOs pueden comportarse como reservorio plasmático de óxido nítrico.

Se ha especulado con la posibilidad de que la bioactividad de los nitrosotioles tenga relación con su estructura y estabilidad *in vivo*. La  $t_{1/2}$  de los nitrosotioles, está

fuertemente influenciada por el tipo de tiol, pH, tensión de oxígeno, estado redox y la presencia o ausencia de metales de transición contaminantes. La  $t_{1/2}$  de las nitrosoproteínas en plasma se ha estimado en  $\sim 40$  min<sup>229</sup>, lo que puede considerarse como moléculas relativamente estables, especialmente comparadas con NO libre o RSNOs de bajo peso molecular (RSNOs-BPM). La ausencia de metales libres en sistemas biológicos ayuda a explicar el predominio de los RSNOs *in vivo*<sup>128</sup>. El efecto de la estructura sobre su acción biológica no se rige aparentemente por un patrón definido; estructuras similares presentan perfiles de actividad muy diferentes, tanto en potencia como en especificidad de tejido, e inversamente; distintas estructuras presentan potencia análoga. Los estudios realizados por Mathews revelan que la naturaleza del grupo R pueda repercutir en la especificidad de tejido de los RSNOs de tal manera que es probable que los RSNOs se unan selectivamente a un posible receptor aún no identificado en la actualidad<sup>230</sup>.

## 6.2- EFECTOS FISIOPATOLÓGICOS de los RSNOs

### A. Efectos hemodinámicos.

En 1990, Myers y otros investigadores<sup>232</sup> comprobaron que la respuesta vasodilatadora de la S-nitrosocisteína presenta una gran similitud con el EDRF, lo que no ocurría cuando el estímulo vasodilatador era el NO. Un tiempo después, Stamler realizó ensayos con S-nitrosoproteínas y comprobó, que salvo la notable excepción de la S-nitrosocatepsina, la respuesta vasodilatadora de las S-nitrosoproteínas difiere de la del NO y de los RSNOs-BPM que inducen una relajación rápida y transitoria. La respuesta de la nitrosoproteínas es menos rápida pero más persistente. El bloqueo de los tioles proteicos con indoacetamida previene la formación de S-nitrosotiol y torna a inactivas las proteínas expuestas a NO. Al igual que otros nitrosodilatadores, su acción es inhibida por azul de metileno, un inhibidor de la guanilato ciclasa<sup>128</sup>.

### B. Acción sobre la agregación plaquetaria

La membrana plaquetaria contiene grupos sulfidrilo esenciales para mantener su funcionalidad. Moléculas con grupos tiol en su estructura, como GSH, cisteína y 6-

mercaptipurina inhiben la agregación plaquetaria. La agregación plaquetaria parece deberse a la existencia de interacciones directas entre los tioles de las proteínas de la membrana<sup>232</sup>. Es posible que los nitrosotioles actúen mediante un mecanismo relacionado con éstas moléculas. Los RSNOs producen inhibición dosis dependiente de la agregación plaquetaria inducida con adenosina difosfato (ADP). La  $t_{1/2}$  del efecto antiplaquetario correlaciona con el efecto relajador de la musculatura lisa vascular<sup>229</sup>. Del mismo modo que ocurre con el efecto vasodilatador, la acción antiagregante es inhibida por azul de metileno y mediante carboxiamidación de los tioles proteicos con iodoacetamida.

### C. Efectos sobre la actividad de Guanilato Ciclasa.

Las acciones vasodilatadoras y antiagregantes de los RSNOs-BPM están mediadas por GMPc. Posteriormente, se ha comprobado este efecto para la nitrosoproteínas mediante la incubación de éstas en fibroblastos pulmonares. Se produce un incremento intraplaquetario de GMPc de un 70% con respecto a la concentración previa a la incubación.

Debido al escaso número de estudios realizados sobre la producción *in vivo* de estos compuestos, en la actualidad, se desconoce en gran medida el papel biológico que pueden desempeñar los nitrosotioles tanto en situaciones basales como en estados patológicos. Es conocido que los niveles plasmáticos de RSNOs se incrementan en estados de activación inmune e inflamación<sup>133</sup>. Recientemente, se ha observado en humanos que la inhibición de NOS produce un descenso de las concentraciones plasmáticas de estas sustancias<sup>224</sup>. No está aún suficientemente probado, pero es posible que el hallazgo de niveles alterados de RSNOs tenga significación fisiológica; por ejemplo, niveles infranormales en plasma podrían sugerir predisposición trombótica debido a la acción inhibitoria de los RSNOs sobre la agregación plaquetaria y la actividad antiaterogénica del NO. La implicación en otras patologías como aterosclerosis, hipertensión o shock séptico no se ha valorado en la actualidad. En ratas se ha observado que los niveles de RSNOs se triplican en el proceso séptico. Sin embargo, la correlación de dichos niveles con el curso clínico del enfermo séptico no ha sido considerada ni en humanos ni en animales grandes.

La determinación de RSNOs aporta información tanto por ser una medida directa de la actividad de NOS<sup>128</sup>, como por la repercusión de las acciones biológicas directas de estos compuestos.

### 6.3- MECANISMO DE ACCIÓN

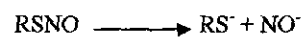
El hallazgo de la producción de RSNOs y su predominio *in vivo*<sup>222</sup>, convierte a estos compuestos en piezas clave para el conocimiento de los procesos fisiológicos relacionados con el EDRF. A pesar de que el efecto de los RSNOs como agentes exógenos con efecto vasodilatador ha sido estudiado ampliamente; el mecanismo celular mediante el cual los nitrosotioles ejercen su acción biológica, permanece aún bastante oscuro. Para dilucidar el modo de acción de estos compuestos hay que contemplar todos los factores que potencialmente pueden influir: su estabilidad, características químicas, capacidad de penetración celular, su probable interacción con receptores específicos, su posible efecto como meros transportadores de NO etc. De la consideración de estos aspectos surgen diferentes hipótesis que tratan de explicar dicho mecanismo:

- **Efecto de la estabilidad química de los nitrosotioles como donadores de NO y sus metabolitos derivados.** En un principio, debido en parte, a la inestabilidad química de los nitrosotioles, se contempló la posibilidad de que la actividad biológica de éstos pudiera ser consecuencia directa de su rápida descomposición, con la consiguiente producción de NO en disolución. Dicha inestabilidad ha sido erróneamente atribuida debido a una inusual reacción de descomposición homolítica y a que generalmente el estudio se ha centrado sobre la S-nitrosocisteína, que rápidamente libera NO *in vitro*<sup>233</sup>. Consecuentemente, estos trabajos han llevado a considerar equivocadamente a los nitrosotioles como moléculas extremadamente inestables y cuya acción biológica solo podría tener lugar a través de la liberación de NO. Los estudios realizados por Mathews y otros autores acerca de la estructura y estabilidad en disolución de estos compuestos, han podido demostrar que no existe correlación entre dicha estabilidad química y las actividades biológicas propias de los nitrosotioles, como la estimulación de la guanilatociclase, inhibición de la agregación plaquetaria y relajación de la musculatura lisa vascular<sup>225,234,230</sup>. Esta disparidad entre la estabilidad en disolución y su actividad, lleva al autor a concluir que la

descomposición de los RSNOs produciendo NO en solución no es responsable de la actividad de éstos.

- **Activación proteica directa a través de reacciones de transnitrosilación y formación de disulfuros.** El efecto celular directo de la nitroso-albúmina, nitrosotiol predominante en el plasma<sup>222</sup>, no parece probable en principio, ya que por su elevado tamaño, no es capaz de atravesar la membrana celular. Sin embargo, es posible que existan mecanismos por los cuales los nitrosotioles puedan activar directamente la guanilatociclasa, a través de reacciones de transnitrosilación del *sitio activo hemo* para formar catalíticamente NO-hemo activo, sin que sea obligada la liberación de NO<sup>•235</sup>. En estudios realizados recientemente por Arnelle relacionados con la descomposición de los RSNOs se demuestra que éstos son capaces de actuar en condiciones fisiológicas como donadores de NO<sup>+</sup>, NO<sup>•</sup> y NO<sup>-</sup><sup>236</sup>:

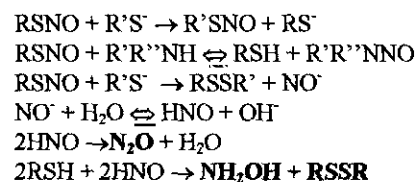
1. En los sistemas biológicos es muy común la descomposición de los RSNOs a través de mecanismos heterolíticos, en las cuales los RSNOs transfieren NO<sup>+</sup> (ión nitrosonium) originando reacciones de transnitrosación<sup>128</sup>.



2. Liberación espontánea de NO<sup>•</sup> por descomposición homolítica. En los sistemas biológicos esta liberación ocurre de un modo mucho más lento y apenas cuantitativamente relevante<sup>237</sup>.



3. Otra reacción que tiene lugar como consecuencia de la descomposición de los RSNOs y que indica liberación de NO<sup>•</sup> es la formación de disulfuros que se acompaña de producción de hidroxilamina y óxido nitroso:



La transnitrosación y la aceleración de la formación de disulfuros sugieren mecanismos de regulación en la función proteica a través de la mediación de los nitrosotioles, y apoyan el concepto de que la actividad biológica de éstos, puede estar

asociada con su descomposición homolítica y fundamentalmente heterolítica. Además de la activación de proteínas *in vivo*<sup>128, 238</sup>, la descomposición heterolítica de los tionitritos se ha implicado en otros procesos fisiológicos como la inhibición de la neurotoxicidad producida por glutamato<sup>134</sup>, los efectos antibacterianos de algunos RSNO<sup>239</sup> y la inhibición de enzimas que contienen grupos sulfidrilos<sup>227</sup>.

- **Liberación de NO en la superficie de la membrana celular.** Otro mecanismo propuesto, es la descomposición de los RSNOs en la superficie celular en vez de en solución, produciendo así NO, que por su naturaleza lipofílica, atraviesa la membrana celular para activar la guanilatociclasa. La generación de NO en la superficie celular parece ser un mecanismo factible para explicar la actividad de los RSNOs<sup>240</sup>.

Un estudio realizado en plasma humano revela el grado de liberación de NO procedente de los nitrosotioles no se incrementaba en presencia de hematíes, lo que sugiere que el metabolismo en sangre del NO es dependiente de los componentes plasmáticos. Estos autores postulan que los RSNOs derivados de los tioles proteicos junto con el ascorbato, son los nitrosotioles que contribuyen en mayor medida a la  $t_{1/2}$  plasmática de los RSNOs por ser cuantitativamente más relevantes<sup>241</sup>.

#### 6.4- **Los RSNOs como posibles responsables de la actividad del EDRF**

Recientemente, Myers<sup>211</sup> y colaboradores han comprobado que la respuesta del endotelio a estímulos como bradiquinina o a un ionóforo de Calcio (A23187) no se explicaba enteramente por la liberación de óxido nítrico. Esta respuesta sólo es explicable bajo la hipótesis de que la verdadera naturaleza del EDRF sea un compuesto que contiene óxido nítrico en su estructura pero que posea una capacidad vasodilatadora mayor que éste. Los RSNOs contienen NO debido a que éste se une con un grupo sulfidrilo a través de la reducción de un electrón:





Dicha incorporación confiere al NO una mayor estabilidad y potencia<sup>229</sup>. Estas propiedades convierten a los RSNOs en sustancias que hipotéticamente pueden responder a las características del verdadero EDRF y explicar así las divergencias existentes entre éste y el NO.

Myers y otros investigadores<sup>231</sup> han realizado pruebas con S-nitrosocisteína que han permitido comprobar que la respuesta vasodilatadora producida por ésta, presenta una gran similitud con el EDRF, lo que no ocurría cuando el estímulo vasodilatador era el NO. Una posible razón que puede explicar esta diferencia de potencia es la variabilidad en cuanto a la estabilidad de estas sustancias en el bioensayo. Al estudiar dicha estabilidad, se comprobó que aunque la  $t_{1/2}$  de estos compuestos parece similar al NO en las condiciones del ensayo, la degradación que tiene lugar durante ella no lo es. La pérdida absoluta de potencia del EDRF y la N-acetilcisteína en una vida media (30s), es sustancialmente menor que la del óxido nítrico durante el mismo periodo de tiempo<sup>211</sup>.

Wei y colaboradores<sup>243</sup> llevaron a cabo un estudio sobre la actividad de los tionitritos con un planteamiento diferente. Realizaron el estudio en endotelio de arteriolas cerebrales y revelaron que la aplicación tópica de  $H_2O_2$  produce anulación de la respuesta del endotelio a la acetilcolina. Además, el  $H_2O_2$  inhibe las respuestas a nitroprusiato y NO, pero no afecta a las respuestas a la adenosina y de N-acetil-L-cisteína. Estos resultados muestran que la acción inhibitoria del  $H_2O_2$  sobre los nitroprusiats, probablemente se produzca por oxidación de los grupos tiol, evitándose así la formación de nitrosotioles. El EDRF producido por acetilcolina y S-nitroso-L-cisteína producían dilatación aún en presencia del bloqueo inducido por  $H_2O_2$  lo que sugiere que el efecto del EDRF es un nitrosotiol similar al S-nitroso-L-cisteína.

Furchgott<sup>242</sup> y colaboradores al igual que Wei<sup>243</sup> y otros autores finalmente concluyen que el EDRF se comporta de una forma más similar a los RSNOs que al NO. Estudios posteriores realizados *in vivo*, ponen de manifiesto que las nitrosoproteínas, producen un efecto vasodilatador más persistente<sup>229</sup>, lo que podría explicar las diferencias en cuanto al efecto vasodilatador del EDRF y el NO.

Todo parece indicar que el EDRF pudiera estar compuesto por varios tipos de nitrosotioles lo que justificaría las diferencias observadas entre diversas especies y lechos vasculares, en cuanto a su  $t_{1/2}$  y actividad biológica. Estos hallazgos convierten a los RSNOs en compuestos de suma relevancia biológica de los que aún se desconocen con profundidad los factores que influyen en su formación y actividad, abriéndose así nuevas expectativas en el conocimiento y manipulación farmacológica de los efectos del EDRF. Stamler y posteriormente otros grupos han comprobado que la suplementación *in vitro* con tioles biológicos potencia la acción del EDRF<sup>244,245,246</sup>. Esto evidencia que los grupos tiol reaccionan con NO $\cdot$  para formar S-nitrosotioles provocando de este modo el aumento del efecto vasodilatador<sup>211</sup>. Mark y colaboradores han valorado los efectos vasculares de la administración de N-acetilcisteína en humanos, mediante la estimación de la respuesta endotelial a la metacolina<sup>247</sup>. Su hipótesis consiste en que si la actividad del EDRF se debe únicamente al NO $\cdot$ , la suplementación con grupos tiol potenciaría la respuesta hipotensora de la metacolina. En cambio, si la bioactividad del EDRF se debe a la existencia de la formación de un derivado *in vivo*; entonces, la infusión de tiol produciría tan solo un incremento leve de la respuesta. El resultado que obtuvieron fue que no se producían cambios en la respuesta a la metacolina con la administración de N-acetilcisteína, lo que confirma la función de los nitrosotioles como posibles responsables de la actividad del EDRF en plasma y músculo liso vascular. Por otra parte, se pone de manifiesto que la formación de RSNOs no depende de la concentración en exceso de grupos tiol disponibles sino que debe estar influenciado por el estado redox u otros factores.

Nuestro trabajo analiza los efectos hemodinámicos de los RSNOs-BPM mediante el aporte exógeno de glutatión y hace una valoración de la importancia del estado redox en la actividad de éstos. Para ello se administra glutatión tanto en animales control como en los sépticos en los que la producción de NO es elevada.

## **7. EFECTO VASOPRESOR de la Hb: Interacción con NO y RSNOs**

Es conocido desde hace varios años, que las soluciones de hemoglobina son capaces de influir sobre la presión arterial<sup>248,249</sup>. Malcom demostró que la hemoglobina producía un incremento del 25-30% de la presión arterial de un modo dosis-

dependiente en los primeros 15 minutos posteriores a su administración y este efecto era mantenido a lo largo de 5 horas. Aunque los efectos no están plenamente caracterizados, esta actividad presora se ha atribuido a la amplia capacidad de la hemoglobina como atrapador de NO<sup>250,251</sup>. Este hecho ha sido confirmado por Kilbourn en un estudio comparativo de diferentes tipos de Hb sobre la capacidad de éstas para compensar la hiporeactividad a  $\alpha_1$ -agonistas producida por endotoxina *in vitro*. Se observó que tanto la Hb oxigenada como la desoxigenada presentaban similar efecto revertidor; sin embargo la formación de cianomet-Hb, Hb incapaz de interaccionar con el NO, no modificaba la hiporeactividad vascular de las preparaciones tratadas con endotoxina<sup>252</sup>. Jia y colaboradores trabajaron sobre la capacidad vasoconstrictora *in vitro* de tres tipos de hemoglobinas y hemoglobinas modificadas de tal forma que los grupos SH de las cisteínas y el grupo hemo no fueran capaces de fijar NO. El efecto vasoconstrictor producido fué menor en el caso de las hemoglobinas modificadas, lo que confirma la influencia del NO, pero no descarta que otros mecanismos puedan estar implicados<sup>253,254</sup>.

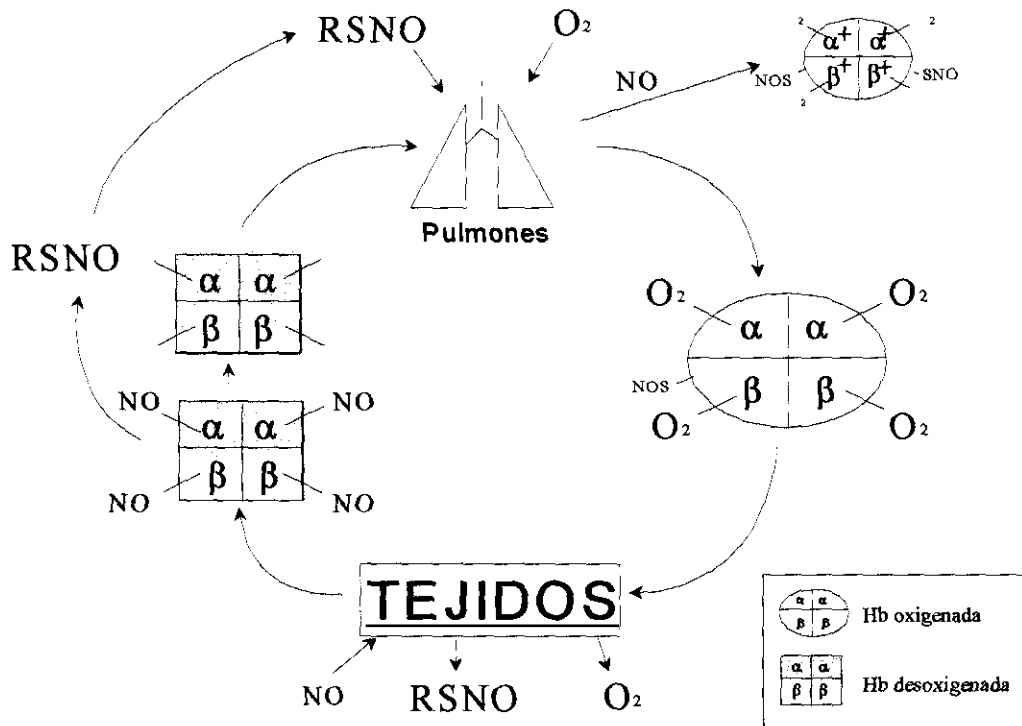
La hemoglobina ha sido considerada como el principal captador fisiológico de NO *in vivo*, de hecho la hemoglobina posee una afinidad por el NO al menos diez mil veces superior a la del oxígeno<sup>255</sup>. Hasta 1996 era mayoritariamente admitido que el NO reaccionaba casi instantáneamente con la Hb para ser destruido generando una carga positiva en la Hb. El grupo de Stamler ha hallado que el NO además de ser metabolizado por los grupos hemo, interacciona cisteínas de la Hb formando SNO-hemoglobina<sup>253</sup> y postularon que los nitrosotioles son compuestos intermediarios que actúan transfiriendo NO, ejerciendo como moléculas reguladoras de la reactividad del NO con la Hb.

Wennmalm y colaboradores han verificado que la incubación de NO con hematíes origina diferentes especies dependiendo del estado de oxigenación: en sangre arterial (saturación de oxígeno 94-99%) el NO principalmente convertía la Hb(Fe<sub>II</sub>)O<sub>2</sub> a Hb(Fe<sub>III</sub>)O<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y un pequeña proporción de Hb(Fe<sub>II</sub>)NO. Sin embargo, la proporción en la sangre venosa (36-85% saturación de oxígeno) se invierte<sup>256</sup>. Esta dependencia del estado de oxigenación en el metabolismo del NO con la Hb se ha confirmado *in vivo* aunque las proporciones no parecen ser las mismas. Jia y colaboradores demostraron que también *in vivo* tiene lugar la formación

intraeritrocitaria de SNO-Hb, siendo esta reacción igualmente dependiente del estado de oxigenación. En general, salvo la excepción de la Hb(Fe<sub>II</sub>)NO, la formación de SNO-Hb es sustancialmente mayor en sangre arterial<sup>253</sup>. Si la reactividad de la Hb con el NO es dependiente del estado de oxigenación, parece lógico que su capacidad vasoconstrictora esté influenciada, al menos parcialmente, por dicho estado. Sin embargo, Kilbourn halló similares efectos vasculares en Hb oxigenada y desoxigenada<sup>252</sup>.

En cuanto a la influencia de la interacción del NO con otros grupos tiol, los RSNOs no forman compuestos estables con el grupo hemo, tanto en el caso de la deoxiHb como la oxihemoglobina. Participan en reacciones de transnitrosación con grupos sulfidrilos de la hemoglobina<sup>253</sup>. La incubación de eritrocitos con S-nitrosocisteína produce una rápida formación intracelular de SNO-Hb(Fe<sub>II</sub>)O<sub>2</sub>. Esta formación de SNO-Hb intraeritrocitaria no predomina en la misma proporción cuando la incubación se realiza con S-nitrosoglutatión (GSNO).

De acuerdo con estas observaciones, la reactividad del NO tanto con los grupos tiol proteicos como con los grupos hemo depende del estado de oxigenación. La diferencia arterio-venosa en el contenido de SNO-Hb, condujo a Stamler al razonamiento de que debe producirse liberación de NO durante el tránsito de los hematíes por los tejidos. Según esta hipótesis, el NO se une a los grupos sulfidrilo de la Hb y ésta transporta NO desde y hacia los tejidos de forma análoga a como lo hace con el oxígeno<sup>253,257</sup>. Este hecho convierte a la Hb en una molécula reguladora de la liberación de NO en función del estado de oxigenación. Previamente, Masuda había hallado que la inhibición de la síntesis de NO exacerba la disminución de la saturación de oxígeno de la Hb producida por etanol<sup>258</sup>; lo que indirectamente implica una dependencia del metabolismo del NO con el estado de saturación de oxígeno de la hemoglobina y por lo tanto con la oxigenación tisular. Este hecho está en consonancia con la hipótesis de Stamler acerca de la Hb como una molécula reguladora y no como mero destructor de NO<sup>253</sup>.



**Fig I-11: Esquema de la regulación alostérica de la Hb en cuanto a su afinidad por el NO.** La oxi-Hb cuando llega a los tejidos sufre una transformación alostérica que favorece la liberación del NO que va unido a sus grupos -SH.

La reacción del NO con la Hb está controlada alostéricamente (ver fig I-11) en cuanto a su interacción con los grupos SH de la cisteína 93 $\beta$  y por el estado spin del hierro del grupo hemo: la reactividad con el NO es elevada en la oxi o estructura R; mientras que es baja en caso de la deoxi o estructura T. La liberación de oxígeno en los tejidos se acompaña de una transformación alostérica de R a T causando la liberación de NO del grupo 93 $\beta$  que posiblemente sea transferido a pequeños tioles que pueden retornar a sus receptores endoteliales. El método experimental empleado para probar que la liberación de NO está regulada mediante cambios alostéricos de la Hb ha sido cuestionado metodológicamente; ya que los autores provocaban dicha transformación alostérica con ditionito, sustancia que destruye instantáneamente el NO<sup>255</sup>. Un estudio posterior realizado nuevamente por el grupo de Stamler confirma químicamente que la reactividad de la Hb con el NO es dependiente del estado de oxigenación y de la relación NO:Hb<sup>259</sup>. Este último hallazgo es de extraordinaria relevancia en el enfermo séptico ya que pone de manifiesto que la interacción NO-Hb probablemente varíe dependiendo de la cantidad de NO generado en la sepsis. Esta regulación no ha sido contrastada en experimentos *in vivo* y está por demostrar si tiene repercusión hemodinámica.

Es importante considerar que los efectos vasopresores de la hemoglobina no se deben enteramente a su capacidad como captador de NO. La actividad vasoconstrictora de la Hb ha sido atribuida a diversos factores:

- Al menos parcialmente su actividad vasoconstrictora se produce por el efecto mediador de la Hb en la transformación de proendotelina a endotelina<sup>251</sup>. No existen aún datos concluyentes sobre la magnitud del efecto de la endotelina como mediador de la vasoconstricción producida por la Hb. En el estudio realizado por Schultz y colaboradores se analiza la actividad vasoconstrictora de la Hb en presencia de fosforamidón, un inhibidor de la conversión de proendotelina a endotelina, encontrándose que éste abolía en un 75% la acción de la proendotelina sobre la presión arterial media (PAM) y en un 70% la de la Hb. Según estos resultados, el 85% de la acción vasoconstrictora de la Hb debería atribuirse a su efecto activador de la endotelina y tan solo un 5% a otros factores. Este hecho contradice la relación que establecen los propios autores y otros investigadores entre el efecto vasopresor de la Hb y el NO<sup>251</sup>.
- El aumento de la demanda de oxígeno, producido por la Hb, ha sido relacionado con su efecto vasopresor. Sin embargo, parece ser independiente de su actividad vasoconstrictora<sup>260,261</sup>.
- Finalmente, no hay que descartar que otros mecanismos puedan estar implicados. Por ejemplo, es posible que la Hb actúe a través de la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica<sup>262</sup>; la liberación de eicosanoides vasoactivos<sup>263</sup>; el metabolismo de la Hb a bilirrubina<sup>264</sup> o a través de su efecto directo sobre el nervio perivascular y las paredes arteriales<sup>265,266,267</sup>.

Se han desarrollado numerosos estudios e incluso ensayos clínicos para valorar el efecto de las soluciones de hemoglobina como potenciales resucitadores del paciente séptico<sup>268</sup>. A pesar de su efecto vasopresor beneficioso en el enfermo crítico, se han descrito numerosos reacciones adversas<sup>269</sup>:

- La pCO<sub>2</sub> arterial es significativamente mayor en animales tratados que en los no tratados.

- Se incrementan los niveles plasmáticos de bilirrubina y la fosfatasa alcalina; lo que puede ser consecuencia de que la Hb empeore la perfusión de determinados órganos como el hígado. Este descenso de los flujos se ha descrito en animales sépticos tratados con inhibidores de la NOS no selectivos<sup>270, 271</sup>.
- El número de bacterias circulantes en sangre venosa periférica es significativamente mayor en animales tratados con Hb.
- La Hb no parece restaurar la disfunción pulmonar aguda inducida por la sepsis<sup>272</sup> pudiendo incluso exacerbarla<sup>273</sup>.

Los mecanismos que posiblemente contribuyan a los efectos perjudiciales de la Hb son muy diversos. Los hematíes lisados presentan capacidad de fijar proteínas del lipopolisacárido bacteriano incrementando la actividad biológica de la endotoxina<sup>274, 275</sup>. También se ha demostrado que es capaz de estimular la liberación de IL-8 y TNF- $\alpha$  en células mononucleares<sup>276</sup>. Además es capaz de inducir una respuesta inflamatoria independiente de la endotoxina, y empeorar el aclaramiento bacteriano<sup>277, 272</sup>. Estos efectos globalmente provocan un empeoramiento de la perfusión microvascular, exacerbación de la respuesta inflamatoria e interferencia en la capacidad respuesta de huésped; lo que se traduce en un potenciamiento de los cambios fisiopatológicos y aumento de la mortalidad<sup>272</sup>.

Alguno de éstos efectos secundarios se han mitigado mediante el empleo de soluciones de Hb modificadas, “diaspirin cross-linked hemoglobin”, obteniéndose una afinidad por el oxígeno similar a la fisiológica<sup>251</sup>.

#### 7.1- ¿POR QUÉ los HEMATÍES NO poseen el EFECTO VASOPRESOR de la Hb?

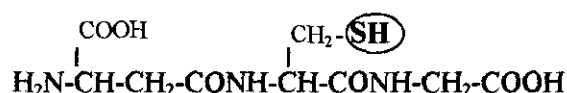
La justificación de este hecho no parece hallarse en la penetrabilidad del NO a través de la membrana eritrocitaria ya que el modelo cinético y el cálculo de la difusibilidad del NO libre en sangre indica que la hemoglobina debería captar y

metabolizar todo el NO generado, no permitiendo que éste llegara a manifestar su actividad<sup>278</sup>.

Un hipotético argumento que explique este fenómeno es que el NO, además de interaccionar con la Hb lo haga con otros grupos SH intraeritrocitarios y extraeritrocitarios impidiendo que la Hb capte en su totalidad el NO circulante. La molécula portadora de grupos tiol predominante en el hematíe es el glutathion.

### **Efecto del glutathion sobre la reactividad del NO**

El glutathion es un tripéptido ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycolic) que alcanza concentraciones intracelulares de 10 nM<sup>279</sup>, involucrado en diversos procesos celulares como la defensa antioxidante celular, la detoxificación xenobiótica, antiagregante plaquetario y el transporte de aminoácidos<sup>280</sup>. La actividad antioxidante del glutathion reside en la capacidad reductora del grupo tiólico de la cisteína que presenta una disposición espacial menos susceptible al ataque de sustancias oxidantes en comparación con otros compuestos con grupos sulfidrilo<sup>281</sup>. En condiciones de stress oxidativo como el shock séptico, la célula responde aumentando los niveles de GSH como resultado de una estimulación de su biosíntesis, lo que permite una cierta adaptación al stress.



Recientemente se ha demostrado que la exposición de neutrófilos humanos a NO, origina la transformación intracelular de GSH a GSNO<sup>282</sup>. Este hecho corrobora que el glutathion pueda desempeñar un papel regulador importante en la reactividad intracelular del NO.

El glutathion es muy abundante en el alveolo pulmonar humano donde reacciona con el NO formando S-nitrosogluthion cuya vida media es de varias horas; muy prolongada comparada con la del NO *in vivo* que es del orden de segundos. El nitrosogluthion reduce la toxicidad del NO y relaja el músculo de las vías aéreas humanas<sup>255</sup>.



Un estudio realizado en plasma humano revela que los tioles cuantitativamente más relevantes en plasma, albúmina y ascorbato, contribuyen en mayor medida a la vida media de los RSNOs<sup>241</sup>. El tiol predominante en el eritrocito es el glutatión, lo que sugiere, que análogamente a lo observado en plasma, el glutatión sea un probable factor regulador de las rutas metabólicas del NO intraeritrocitario. De hecho la incubación de hematíes con GSNO conlleva la formación limitada de SNO-Hb intraeritrocitaria<sup>253</sup> lo que puede indicar que la transferencia de NO entre el GSNO y la Hb sea un equilibrio inestable. Fisiológicamente se ha comprobado la formación de RSNOs intraeritrocitarios.

Otro hecho que induce a la consideración de que el GSH puede jugar un papel fundamental en la regulación de la actividad de NO, es el hallazgo de que el glutatión origina una activación muy marcada de la guanilatociclasa en condiciones anaerobias<sup>283</sup>. Esto refleja que puede existir un modo de regulación de la actividad del NO relacionado con la *modulación redox* de los sitios activos del enzima.

Jia y colaboradores observaron *in vitro*, que el glutatión produce potenciación de los efectos vasodilatadores de la SNO-Hb(Fe<sup>II</sup>)O<sub>2</sub> y SNO-Hb(Fe<sup>III</sup>) y además se detectó formación de S-nitrosoglutatión lo que sugiere la existencia de reacciones de transnitrosación intraeritrocitaria. A la vista de estos resultados los autores concluyen que:

- El equilibrio entre RSNOs y Hb tiene lugar a través de la formación de SNO-Hb en circunstancias fisiológicas.
- Pueden ocurrir reacciones de transnitrosación entre el glutatión y SNO-Hb en el interior de los hematíes, donde se ha verificado la presencia de RSNOs de bajo peso molecular en eritrocitos cargados de SNO-Hb.
- La oxidación del centro metálico de la Hb torna el equilibrio hacia la formación de GSNO, potenciando su actividad.

Poco tiempo después de que Jia constatará esta interacción de la Hb con los RSNO junto con la formación in vivo de GSNO y propusiera al glutatión como uno de los posibles factores relacionado; Singh describió la química del sistema S-nitrosoglutation / glutatión<sup>284</sup>. La concentración intracelular de NO es sustancialmente menor que la de GSH, por lo tanto el glutatión predominará siempre cuantitativamente sobre el GSNO. Reproduciendo esta proporción, Sigh valoró, los efectos de la interacción de GSNO con GSH en exceso en una disolución, y comprobó que el producto mayoritario no es el NO, como muchos autores habían especulado, sino que se forma  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ , glutatión oxidado (GSSG) y nitritos lo que revela una nueva química de los RSNO.

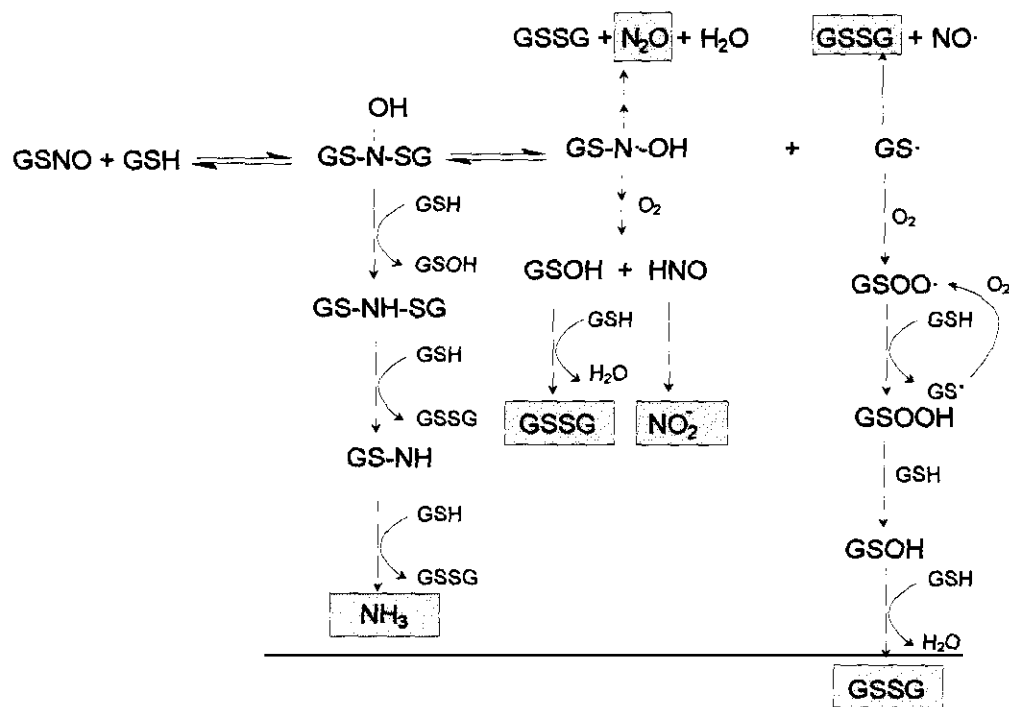


Fig I - 12: Química GSNO-GSH

Estos hallazgos fortalecen la hipótesis de Stamler de que la actividad biológica de los RSNOs, no reside necesariamente en la liberación de NO sino puede estar asociada tanto a mecanismos homolíticos como heterolíticos.

Las repercusiones hemodinámicas de la interacción glutatión-hemoglobina como moléculas hipotéticamente reguladoras del metabolismo intraeritrocitario del NO es una cuestión que se desconoce en la actualidad. Nuestro trabajo está dirigido a esclarecer los

efectos hemodinámicos de esta interacción. La hipótesis barajada por nuestro grupo es que los hematíes carecen del efecto vasoconstrictor de la Hb debido a su contenido en glutatión y a las reacciones de trasnitrosación que se establecen entre la Hb y el GSH.

## ***OBJETIVOS***

La sepsis, enfermedad que causa una importante mortalidad, se caracteriza por graves alteraciones fundamentalmente hemodinámicas y metabólicas cuyo origen no está plenamente dilucidado. Por ello, es de especial interés el conocimiento de los complejos mecanismos bioquímicos y fisiológicos que causan dichas alteraciones; así como lograr métodos que permitan monitorizar adecuadamente al paciente séptico y obtener terapias más eficaces que las existentes en la actualidad.

Con la finalidad de profundizar en esta parcela del conocimiento científico, el eje central de este estudio es demostrar el papel de la interacción del NO con otras moléculas fisiológicas, como la hemoglobina y los tioles de bajo peso molecular, en la fisiopatología de los cambios cardiovasculares de la sepsis.

#### **OBJETIVOS:**

- 1.- Demostrar que la hemoglobina produce cambios hemodinámicos sistémicos y regionales en la sepsis, consistentes con un efecto captador de NO circulante.
- 2.- Demostrar que el glutatión produce cambios hemodinámicos en la sepsis debidos a la reacción de los grupos -SH con el NO (formación de nitrosotioles).
- 3.- Demostrar que existe una interacción entre el glutatión y la hemoglobina mediante reacciones de transtirosación en la sepsis.
- 4.- Demostrar que la liberación de NO en la sepsis induce lesión celular; lo que se puede probar mediante la identificación de cambios inmunohistoquímicos (detección de nitrotirosina en muestras de tejido).
- 5.- Demostrar en este modelo que la sepsis aumenta la producción de nitrosotioles como manifestación del aumento de la producción de NO.

**HIPÓTESIS:**

## HIPÓTESIS DEL OBJETIVO 1

1. La hemoglobina produce efectos hemodinámicos en la sepsis debidos a la captación de NO.

## HIPÓTESIS DEL OBJETIVO 2

2. La captación de NO por la hemoglobina sucede en los grupos –SH (presentes en los residuos de cisteína), para formar nitrosohemoglobina; por tanto, esta interacción es susceptible de sufrir reacciones de transnitrosación con otros tioles.

## HIPÓTESIS DEL OBJETIVO 3

3. El glutatión revierte los efectos vasoconstrictores de la hemoglobina.

## HIPÓTESIS DEL OBJETIVO 4

4. La liberación de NO en la sepsis induce daño celular que puede ser identificado mediante la detección por inmunohistoquímica de residuos de nitrotirosina.

## HIPÓTESIS DEL OBJETIVO 5

5. El aumento de la formación de NO en la sepsis da lugar a una elevación de nitrosotioles.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

En este estudio se han analizado dos tipos de modelos séptico, cada uno de ellos destinado a demostrar un objetivo:

### 1. Modelo de sepsis porcina:

- Permite realizar un estudio completo de la evolución séptica, especialmente en lo referente a la hemodinámica regional y parámetros de perfusión regional.
- Estimar en este modelo las variaciones que sufren los RSNOs.
- Medir el daño producido por  $\text{ONOO}^-$  en un modelo de sepsis aguda.
- Valorar la Hb como resucitador del shock y sus efectos en la hemodinámica regional.
- Estudiar si existen reacciones de transnitrosación entre la Hb y los grupos tiol.

### 2. Modelo de sepsis en humanos:

Permite valorar qué valores adquieren los niveles de RSNOs en la sepsis humana y si dichos niveles guardan relación con el estado clínico del enfermo.

Para ello se han desarrollado los modelos que a continuación se describen:

## 1. MODELO DE SEPSIS EXPERIMENTAL

El modelo consiste en la inducción de una situación de sepsis mediante la administración intravenosa de un inóculo de *E coli* vivos en cerdos anestesiados. Esta intervención induce los cambios hemodinámicos (vasodilatación sistémica, vasoconstricción pulmonar, hiporespuesta a agentes adrenérgicos, etc.), hematológicos (leucopenia, trombopenia, hemoconcentración) y bioquímicos (acidosis metabólica, incremento de la lactatemia...) característicos del shock séptico.

### A) Protocolo de estudio

El protocolo se ha diseñado para estudiar los cambios hemodinámicos sistémicos y regionales asociados a la sepsis, los efectos de la Hb como molécula captadora de NO, y evaluar el efecto del glutatión como posible molécula que compite con la Hb por el NO. Por ello, el estudio puede englobarse en tres grandes fases consecutivas:

- 1º. Evolución de la sepsis: bioquímica, hemodinámica e inmunohistoquímica.



- 2°. Análisis de los efectos de la Hb.
- 3°. Efectos hemodinámicos del GSH como molécula potencialmente revertidora de la acción de la Hb.

La sepsis se induce en animales anestesiados mediante la administración por vía intravenosa de un inóculo de *E coli* vivos ( $10^8$  UFC/mL) inyectando 1,5 mL/kg en infusión durante 30'. Esta dosis producía cambios hemodinámicos y bioquímicos (ver resultados) compatibles con una situación de shock séptico (hipotensión, disminución de la resistencia vascular sistémica, aumento de la resistencia vascular pulmonar, leucopenia, acidemia, hiperlactatemia e hipoxemia). En estos animales se mantenía una  $FiO_2=1$ , para evitar el factor de confusión de los efectos de la hipoxia (secundaria a la lesión pulmonar asociada a la sepsis) sobre las variables estudiadas; y se infundía suero salino al 0.9% (15 ml/kg/h) durante todo el experimento.

Una vez inducida la sepsis se observa la evolución del animal durante cuatro horas y posteriormente se llevan a cabo las diferentes intervenciones: administración de Hb y GSH. El procedimiento experimental seguido en este trabajo aparece esquematizado en la siguiente figura:

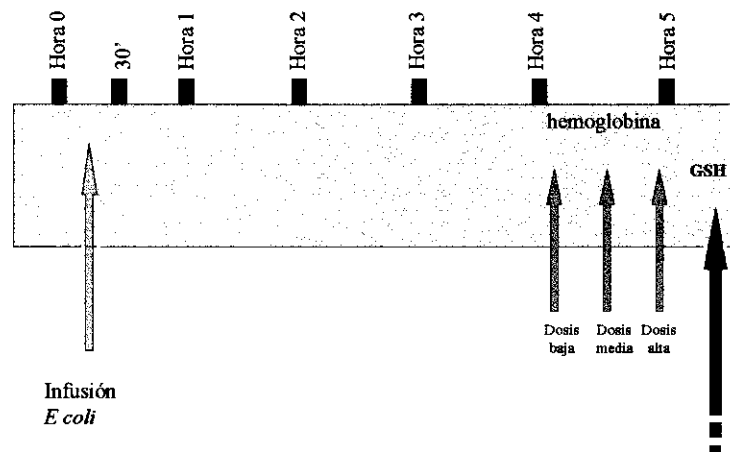


Fig M-1 . Esquema del modelo experimental

Las medidas hemodinámicas se han hecho antes ( $t=0$ ) y después de la infusión del inóculo ( $t=30'$ ), así como en las siguientes horas de evolución posteriores a la inducción séptica: 1h, 2h, 3h, 4h y 5h. Las pruebas bioquímicas y las medidas de RSNOs y nitratos y nitritos se han realizado en estado basal, a la hora de la inducción séptica y en

la cuarta hora de evolución. La  $p\text{CO}_{2i}$  se ha medido antes de la inducción séptica y después de 1, 3 y 4 horas posteriores a la inducción.

Las diferentes intervenciones experimentales en los animales con sepsis se realizaban a partir de la cuarta hora después de iniciar la infusión de *E coli*. Los efectos de la Hb eran medidos a los 15' de la infusión de cada una de las dosis y los efectos del glutathion eran medidos al minuto de su administración y cada 5' durante un periodo de 15'.

Los animales se han agrupado de la siguiente manera:

- Grupo A: 6 cerdos control.
- Grupo B: 6 cerdos control que recibían hemoglobina (100; 200 y 400  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  en infusión continua) seguido de bolo de 1g de glutathion reducido.
- Grupo C: 6 cerdos sépticos.
- Grupo D: 6 cerdos sépticos que recibían las mismas dosis de hemoglobina seguido igualmente de un bolo de 1g de glutathion reducido.
- Grupo E: 6 cerdos control a los que se les administraba un bolo de 1g de glutathion reducido.
- Grupo F: 6 cerdos sépticos a los que se les administraba un bolo de 1g de glutathion.

Adicionalmente, se ha realizado el análisis inmunohistoquímico para determinar nitrotirosina en los siguientes grupos:

- Grupo G: 4 cerdos control
- Grupo H: 3 cerdos sépticos
- Grupo I: 4 cerdos control tratados con Hb
- Grupo J: 4 cerdos sépticos tratados con Hb

Han sido estudiados cerdos jóvenes (22 –27 kg de peso) que eran intubados por traqueostomía y conectados a un respirador volumétrico con una frecuencia respiratoria de 10 ciclos por minuto y un volumen corriente de 15 mL/kg.

**B) MONITORIZACIÓN**

Los animales estaban monitorizados mediante un catéter Swan-Ganz en la arteria pulmonar (5F, Abbott Labs, North Chicago, USA) introducido a través de la vena yugular interna derecha, que permite la monitorización de las presiones arteriales pulmonares y del gasto cardiaco; y un cateter venoso yugular para la administración de líquidos y la infusión de diazepam y morfina ; un catéter en la arteria carótida para la monitorización de la presión arterial y la obtención de muestras de sangre. Las presiones arteriales sistémica y pulmonar se monitorizaban mediante un monitor Hewlett Packard. La presión capilar (de enclavamiento) pulmonar se midió inflando el balón del que está provisto el catéter de Swan-Ganz con 0,5 c.c. de aire hasta que la curva de registro de presión de la arteria pulmonar pierde su morfología normal, sufriendo un aplanamiento hasta valores por debajo del valor previo de la presión diastólica en la arteria pulmonar. El gasto cardíaco se medía con un computador Oximetric SO<sub>2</sub>/CO (Abbott Laboratories, Illinois 60064, USA) mediante la técnica de termodilución y cada medida se realizaba por triplicado, tomando la media como el valor adecuado. Los gases arteriales y venosos se medían con un analizador de gases (ABL 500 Radiometer).

Adicionalmente se realiza una laparotomía y se identifican dos asas del intestino delgado, correspondientes al yeyuno proximal y al íleon distal, para la inserción de dos tonómetros (Tonometrics Inc, Massachussettes, USA) que permiten la medición de la pCO<sub>2</sub> intramucosa intestinal, como indicador del estado de perfusión de la mucosa intestinal.

**Mediciones de flujo:**

Tras la identificación de las estructuras pertinentes, se sitúan sondas para medir el flujo mediante el efecto doppler en la vena porta (Flujo portal = Q<sub>p</sub>), y en la arteria mesentérica superior (Flujo de la arteria mesentérica = Q<sub>m</sub>).

En la pared de los dispositivos utilizados existe un cristal piezoeléctrico diminuto que cuando recibe energía con un aparato electrónico adecuado transmite el sonido a una frecuencia de varios millones de ciclos por segundo. Una parte del sonido

lo reflejan los hematíes del flujo, de tal forma que las ondas sonoras regresan de la sangre al cristal. Estas ondas tienen menor frecuencia que la onda transmitida ya que los glóbulos rojos se están separando del cristal transmisor, éste es el llamado efecto doppler. La onda transmitida se interrumpe de forma intermitente y la reflejada es recibida de nuevo en el cristal y amplificadas considerablemente por el dispositivo electrónico. El equipo permite medir la diferencia de frecuencia entre la onda transmitida y la reflejada, calculándose así la velocidad de flujo de sangre.

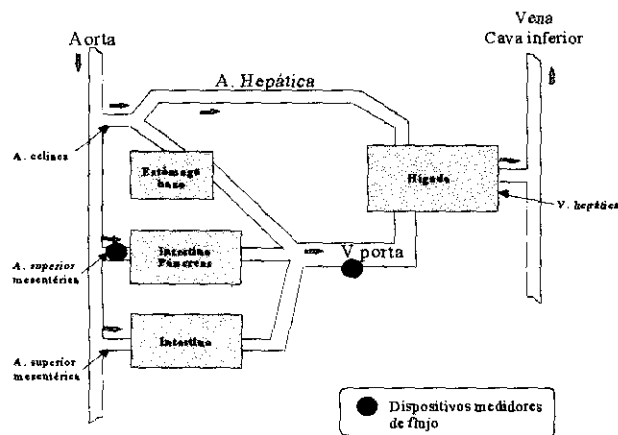


Fig M-2: Situación de los dispositivos medidores de flujo

## C) FÁRMACOS UTILIZADOS

### ANESTESIA

- INDUCCIÓN ANESTÉSICA:

- Ketamina 7-10 mg/kg.
- Fentanilo 5 µg/kg.
- Pentotal 1mg/kg.
- Bromuro de pancuronio 1c.c./30'.

- MANTENIMIENTO:

- Diazepam 0,1mg/kg/h. Morfina (10 mg/h).
- Bolos cada 30' de fentanilo 2,5 µg/kg + Bromuro de pancuronio (1c.c./kg).

#### APORTE DE FLUIDOS:

- Suero salino 0,9%: 40 mL/kg/h.
- Coloides: poligenina (Hemoce®) 0,3 L/kg/h.

Además de la estabilización del animal, se han realizado intervenciones farmacológicas que han consistido en la administración intravenosa en infusión de una solución de Hb, cuya preparación se detalla posteriormente, a las dosis de 100, 200 y 400 mg/kg/h. Posteriormente, los animales recibían 1g de GSH (Sigma G-4251), San Louis, Missouri, USA), disuelto en 10mL de suero salino que se administraba en bolo por vía intravenosa.

#### D) CÁLCULOS HEMODINÁMICOS

Las variables hemodinámicas derivadas se calcularon de acuerdo con las siguientes fórmulas:

- **Índice cardíaco corregido (IC)** ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) = gasto cardíaco (mL/min) / peso corporal (kg).
- **Flujo portal corregido (Qp)** ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) = flujo portal (mL/min) / peso corporal (kg).
- **Flujo mesentérico corregido (Qmes)** ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) = flujo mesentérico (mL/min) / peso corporal (kg).
- **Resistencia vascular sistémica (RVS)** ( $\text{mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{kg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) = [presión arterial media (mm Hg) - presión venosa central (mm Hg)] / IC ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ).
- **Resistencia vascular mesentérica estimada (RVM)** = presión arterial media (mmHg) / flujo mesentérico corregido ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ).

#### E) PREPARACIÓN del INÓCULO BACTERIANO

La cepa bacteriana utilizada en este estudio para la obtención del inóculo deseado procede de una muestra clínica analizada en el “Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario de Getafe” en la que se aisló como agente infeccioso una cepa de *Escherichia coli* en cultivo puro.

Periódicamente se realizan resiembras en placas de Agar Sangre de dicho microorganismo. El día anterior al experimento se inoculan 100mL de medio de cultivo líquido (extracto de carne, agua de peptona y proteasa) con unas dos o tres colonias bacterianas y se inoculan durante 24h a 37°C obteniéndose una suspensión bacteriana de  $10^8$  UFC/mL. La concentración de *E. Coli* alcanzada por el inóculo es constante debido a que la concentración de nutrientes es constante, siendo dicha concentración de nutrientes lo que limita el crecimiento bacteriano hasta este valor.

Dicha concentración bacteriana es confirmada mediante incubación de diluciones seriadas del inóculo obtenido sembradas de forma cuantitativa sobre placas de Agar Sangre las cuales son incubadas bajo las mismas condiciones que el inóculo inicial. Transcurridas 24h se realiza el recuento correspondiente. Los resultados confirman la reproductibilidad del proceso<sup>285, 286</sup>.

### Control del inóculo:

Al estudiar el crecimiento bacteriano de *E. coli* en un medio de cultivo líquido, se observan cuatro fases de desarrollo; variando la velocidad de multiplicación de acuerdo con la siguiente curva:

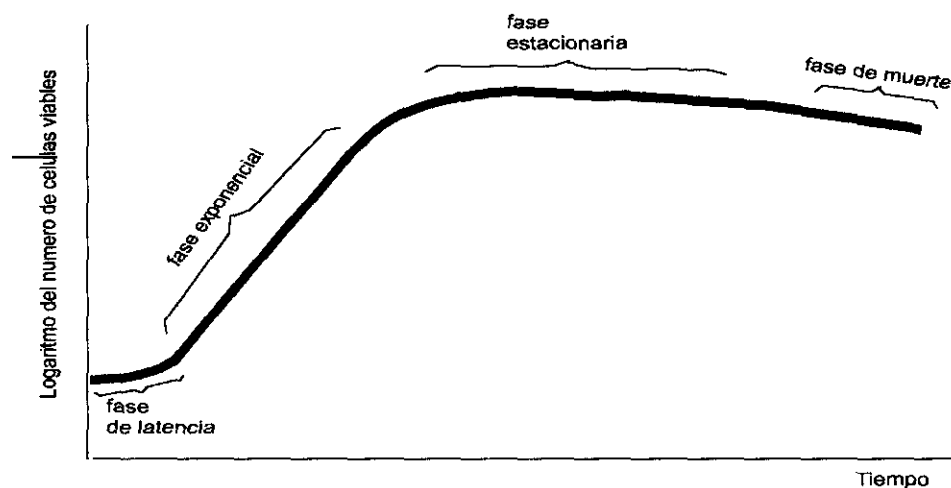


Fig M-3: Curva de crecimiento de un inóculo de *E. coli*

El inóculo comienza su crecimiento de modo exponencial tras un periodo de latencia (Fig M-3). La población bacteriana mantiene este crecimiento durante un tiempo que se halla limitado por el agotamiento de nutrientes disponibles; tras el cual,

las bacterias entran en fase estacionaria. De esta forma, es posible estandarizar el inóculo bacteriano manteniendo constante la concentración inicial de los nutrientes del medio de cultivo. Tras el agotamiento de alguno de los nutrientes cesa el crecimiento exponencial generándose un inóculo constante<sup>286</sup>.

Con el fin de estimar la variabilidad del inóculo con el tiempo se ha llevado a cabo un control del crecimiento bacteriano. Para ello, se ha determinado (por duplicado) la concentración microbiana en diferentes periodos de su desarrollo bacteriano. El cálculo de dicha concentración se ha realizado mediante el recuento de colonias bacterianas tras 8, 20, 22, 24 y 26h de incubación.

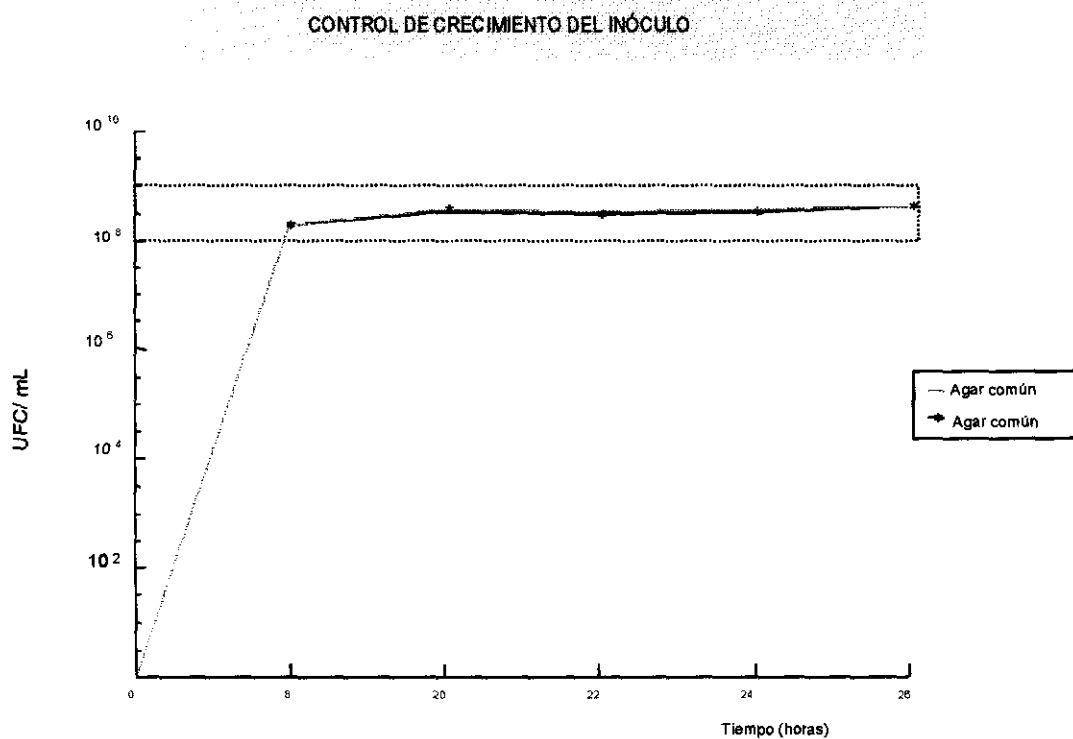


Fig M-4: Curva de crecimiento del inóculo utilizado.

Como puede observarse en estos resultados, las bacterias se hallan en fase de crecimiento estacionario a partir del control de las 20h, lo que garantiza la estabilidad del inóculo en el momento de la infusión (24h después del comienzo del crecimiento).

Un cultivo microbiano en crecimiento equilibrado cumple que la velocidad de aumento de bacterias en un tiempo dado es proporcional al número o masa de bacterias presentes en ese tiempo. La estabilidad en la biomasa va acompañada de constancia en

las demás propiedades medibles de la población como proteínas, RNA, DNA y agua intracelular. Como se observa en la siguiente figura (Fig: M-5), el número de bacterias o masa bacteriana se mantiene en todos los inóculos y por lo tanto el contenido en proteínas responsables de su acción patógena es igual en los inóculos utilizados en el experimento. Dicho de otro modo, esta técnica de preparación hace posible el reproducir un inóculo constante.

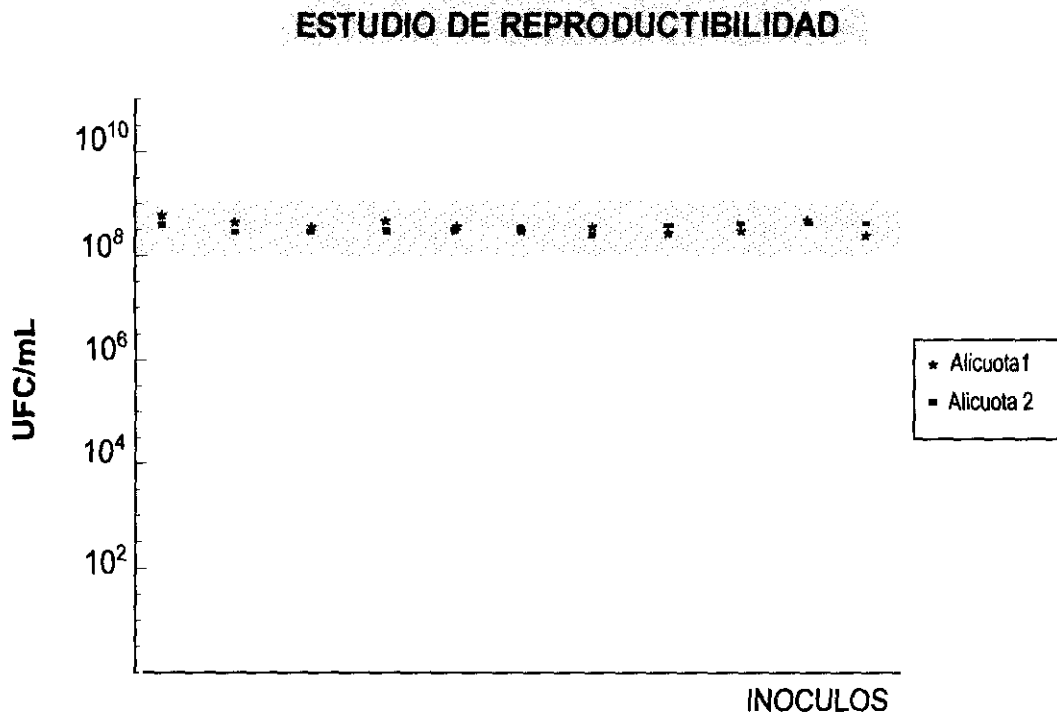


Fig M-5: Reproducibilidad del inóculo: todos los inóculos estudiados mantenían una concentración constante.

## F) TÉCNICAS HEMATOLÓGICAS

### Medición de hemoglobina:

Se ha determinado su concentración tanto en las soluciones de hemoglobina empleadas; como en el seguimiento de la hemoglobinemia de los animales estudiados a lo largo del transcurso experimental. En ambos casos el procedimiento empleado ha sido un "método modificado de Cianmetahemoglobina".

#### *Método modificado de Cianmetahemoglobina*



El método de la cianmetahemoglobina es el método de referencia recomendado por la ICSH (International Committee for Standardization in Haematology)<sup>287</sup>. Frente a otros procedimientos posee ventajas fundamentales:

1. Los tipos de hemoglobina predominantes (hemoglobina, metahemoglobina y carboxihemoglobina) son transformadas a cianmetahemoglobina incluyéndose así en la medición.
2. Los estándares secundarios estables han sido internacionalmente comparados y aprobados por la WHO (World Health Organization) para ser utilizados en la calibración.
3. La cianmetahemoglobina presenta una banda de absorción amplia y relativamente plana a 540 nm, lo que permite su medida mediante diferentes técnicas<sup>288</sup>.

Se requiere la adición de un diluyente que contiene:

- Cianida potásica y ferricianida potásica para efectuar la conversión de los diferentes tipos de hemoglobinas a metahemoglobina.
- Fosfato potásico dihidrogenado para disminuir el pH y así acelerar la reacción *permitiendo la lectura de la absorbancia a los 3 minutos*.
- Detergente no iónico para acelerar la lisis celular y reducir la turbidez debido a la precipitación de proteínas, que es por otra parte consecuencia del bajo pH alcanzado por el fosfato potásico dihidrogenado.

La solución obtenida es medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm utilizándose como blanco de referencia el propio diluyente. Es conveniente que la onda de luz generada por el instrumento sea verificada con una escala de absorbancias de calibradores que consisten en soluciones de cianmetahemoglobina.

Este método ha sido modificado para su aplicación en instrumentos automatizados que incluyen varios agentes lisantes y lecturas de absorbancia en *periodos de tiempos menos prolongados y a diferentes longitudes de onda*. El instrumento utilizado ha sido un analizador hematológico Coulter Max (Miami Florida USA).

*Interferencias:*

Ciertas características patológicas de determinadas muestras pueden conducir a un error de exactitud en la estimación de la Hb:

- La presencia de sulfahemoglobina puede repercutir en una infraestimación de la Hb. Este tipo de Hb está presente en fumadores, circunstancia carente de sentido en una hemoglobina de origen animal.
- El método es sensible a la presencia de turbidez provocada por una leucocitosis extrema y a elevadas concentraciones plasmáticas lipídicas y proteicas. Las muestras en las que ha sido determinada Hb en ningún caso superaban los  $40 \times 10^9$  WBC/L y tanto la concentración de proteínas plasmáticas como la de triglicéridos, son sustancialmente inferiores a las que causan interferencia.

**Recuento leucocitario:**

Se han realizado recuentos leucocitarios tanto en condiciones basales como en los periodos de 1 y 4h posteriores a la infusión bacteriana. La existencia de leucocitosis o por el contrario leucopenia constituye uno los principales parámetros hematológicos diagnósticos de sepsis. El instrumento automático utilizado (Coulter-Max, Miami Florida USA) realiza el recuento por medidas de impedancia con corriente electromagnética de baja frecuencia dependientes fundamentalmente del volumen celular y por desviación de radiaciones luminosas a  $10-70^\circ$  cuando las células son atravesadas por una radiación láser que varía en función del tamaño, estructura y reflectividad de la célula.

## G) DETERMINACIÓN DE S-NITROSOTIOLES

Los S-nitrosotioles presentan una serie de propiedades espectrofotométricas, que permiten su medida por espectrofotometría directa, ya que los derivados de una amina terciaria simple presentan un coloración roja, los tionitritos terciarios son verdes y los RSNOs proteicos son rojo-naranja en el espectro UV-VIS. Sin embargo; éste método tiene dos inconvenientes importantes: por una parte carece de sensibilidad, su límite de detección oscila aproximadamente entre 0.1-10 mM y por otro lado, la luz que emite el espectrofotómetro puede promover la descomposición fotolítica de los RSNOs.

Debido a esta serie de inconvenientes, se ha desarrollado el “*método de Saville*” que en un principio fué pensado para determinar tioles y que posteriormente fue adaptado para la determinación de RSNOs. Es un método altamente sensible cuyo límite de detección oscila entre 1,0- 0,5  $\mu\text{M}$ . En soluciones acuosas puede llegar a detectar concentraciones 0,2  $\mu\text{M}$ <sup>289</sup>. La exactitud del método varía dependiendo de las concentraciones de nitrosotioles a las que se esté trabajando. Saville cifra la exactitud del método para una concentración de 0,2  $\mu\text{M}$  en un 10%, mientras que para concentraciones 10  $\mu\text{M}$  esta variabilidad es tan solo de 2-3% y para concentraciones 40 $\mu\text{M}$  la exactitud oscila entre un 1-2%.

### Fundamento

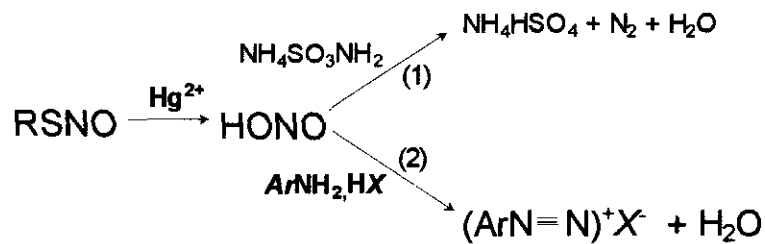


Como se muestra en las expresiones anteriores, la reacción tiene lugar en dos pasos:

(1).- En un primer lugar, el grupo  $\text{NO}^+$  se desplaza de los grupos tiol mediante reacción con el ión mercurio. Esta hidrólisis extremadamente rápida puede ser explicada asumiendo que estos cationes metálicos, poseen alta afinidad por los sulfuros formando una rápida y reversible coordinación con los S-nitrosotioles para formar un complejo, que permite que la lábil unión N-S sea entonces altamente susceptible al ataque nucleofílico de las moléculas de agua:

(2).-Bajo condiciones ácidas (HCL 0,5 mM ), el grupo  $\text{NO}^+$  reacciona con sulfanilamida ( $\text{Ar-NH}_2$ ).

(3).-En un segundo paso, la sal de diazonio (que se forma de modo equivalente a los tionitritos) es acomplejada con una amina aromática, *N*-(1-naftil)-etilendiamina ( $\text{Ar}'$ ) para formar un intenso color que se mide a 540 nm.



La formación de sal de diazonio (2) es prácticamente exclusiva y mucho más rápida que la vía alternativa (1)<sup>289</sup>.

### Reactivos:

Solución A: sulfanilamida 1% en solución 0,5 M HCl.

Solución B: la misma solución A a la que se le añade  $\text{HgCl}_2$  0,2%.

Solución C: solución 0,02% de (*N*-(1-naftil)-etilendiamina dicloruro en HCl 0,5 M.

### Tratamiento de la muestra:

Las muestras extraídas en tubos vacutainer con gel separador eran centrifugadas inmediatamente a 4000 rpm durante 4 min y eran procesadas inmediatamente.

Se han hecho pruebas con muestras plasmáticas empleando  $\text{EDTA-K}^+$  como anticoagulante con el fin de prolongar la  $t_{1/2}$  de los RSNOs, ya que éstos se ven afectados de manera muy importante por la presencia de metales, especialmente de iones  $\text{Cu}^{2+}$ , que son quelados por el EDTA. Sin embargo, se observó que el EDTA reaccionaba con los componentes de la solución B, probablemente quelando  $\text{Hg}^{2+}$  y formando un complejo coloreado que absorbe a la misma longitud de onda lo que origina una interferencia importante para la determinación de RSNOs por este método. También se han realizado mediciones en plasma utilizando heparina de litio como anticoagulante. Sin embargo, no pudo ser aplicado por la aparición de importantes

interferencias por turbidez a pesar de que el plasma era procesado y separado del paquete de hematíes inmediatamente.

### **Procedimiento:**

Se toma un volumen de muestra que puede oscilar entre 50  $\mu\text{L}$  y 1 mL al que se le añade un volumen equivalente de la solución A. Igualmente, se añade un volumen equivalente de solución B para el mismo volumen de muestra. Las dos mezclas se dejan reaccionar durante 5 minutos con el fin de que se complete la formación de la sal de diazonio y posteriormente se añade un volumen equivalente de la solución C en cada una de las mezclas. Esto se realiza en todos los puntos de medida.

Cuando se añade la solución C se desarrolla una coloración que tiene lugar debido a la formación del complejo azoico. El desarrollo del color es rápido, generalmente se completa entre 3 y 5 minutos no aumentando su intensidad en un periodo de tiempo prolongado. Después de 8 minutos se realizan las mediciones frente a un blanco de agua destilada. Las medidas espectrofotométricas se han realizado a una longitud de onda de 540nm en un espectrofotómetro (Hitachi U-2000 Naka Works -modelo 121-0003- Tokio, Japón). La absorbancia debida a los RSNOs se cuantifica mediante la diferencia de absorbancia de la mezcla con solución A menos la absorbancia de mezcla con solución B.

### **Linealidad**

Se ha comprobado el comportamiento lineal de este método, empleando para ello soluciones acuosas con concentraciones crecientes de nitrosoglutation (GSNO) como ejemplo de RSNO.

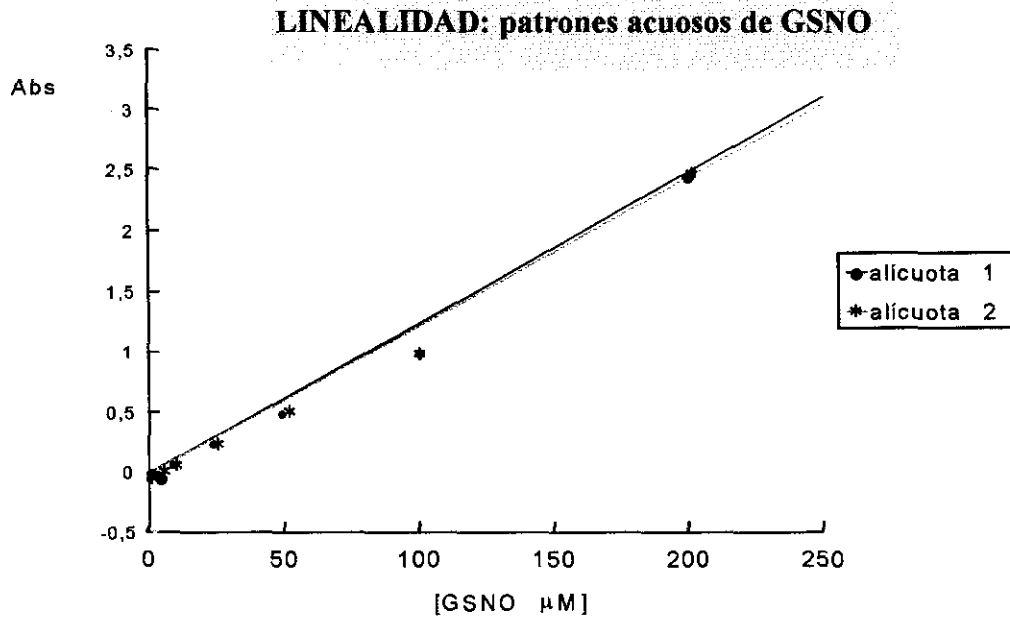


Fig M 6: estudio de linealidad de la reacción de Saville en soluciones acuosas de GSNO.

Así mismo se ha comprobado que esta reacción se comporta igualmente de forma lineal cuando la matriz empleada son sueros humanos. Para ello se ha utilizado un pool de sueros de sujetos sanos procesados 72h después de su extracción con el fin de que se complete la degradación de los posibles RSNOs existentes y se ha añadido cantidades crecientes de GSNO.

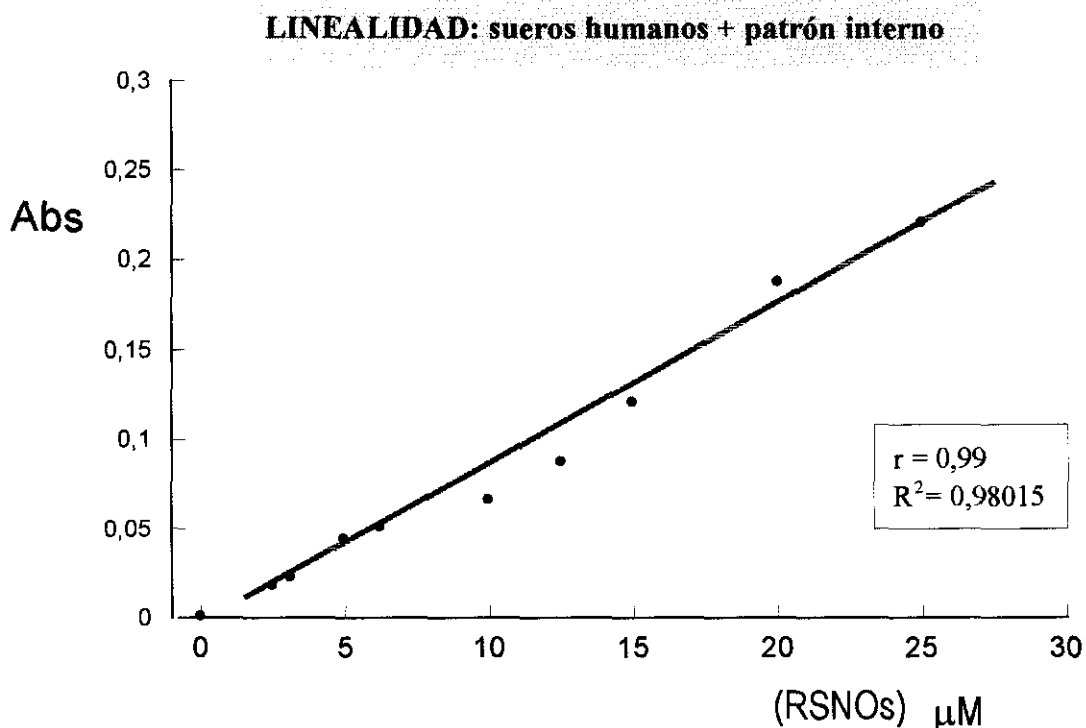


Fig M 7: Estudio de linealidad de la reacción de Saville en sueros humanos + GSNO.

## Patrón interno

La determinación de RSNOs requiere una sensibilidad elevada debido a que las concentraciones plasmáticas de RSNOs son del orden  $\mu\text{molar}$ . Con el fin de incrementar la sensibilidad se ha utilizado un patrón interno.

El patrón interno (PI) es una solución acuosa de GSNO  $50\mu\text{M}$  (SIGMA-N4148). La  $t_{1/2}$  del GSNO en solución acuosa a pH 7,4 y  $37^\circ\text{C}$  es del orden de  $159\text{ h}^{290}$ . Con el fin de aumentar su estabilidad las soluciones de GSNO se preparaban en medio ácido (HCl 0,5 M) y se conservaban en alícuotas a  $-70^\circ\text{C}$  durante un periodo no superior a 2 semanas. Estas soluciones se han preservado de la luz en todo momento para evitar su fotodescomposición.

El PI se añade al volumen de muestra de tal forma que se obtenga una serie de concentraciones crecientes. La concentración de la muestra se calcula mediante extrapolación de la recta obtenida sobre el eje de abscisas como puede verse en el siguiente ejemplo:

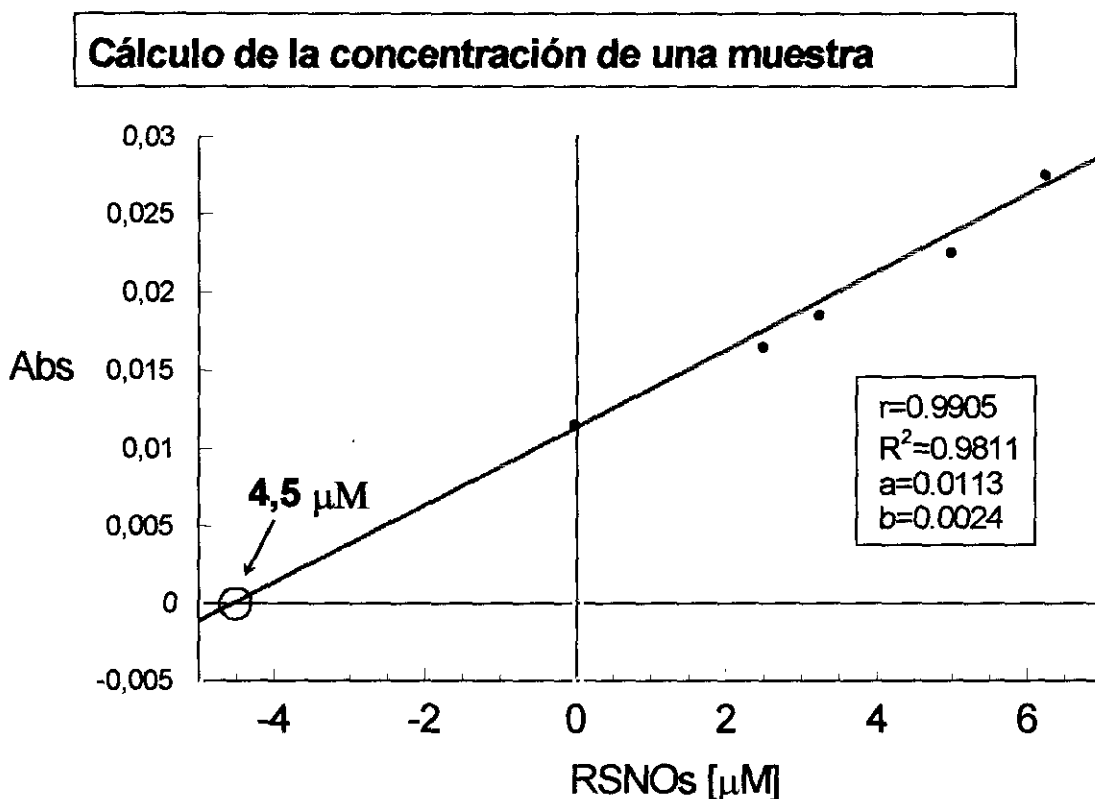


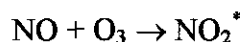
Fig. M 8: Ejemplo del cálculo de la concentración de una muestra.

## H) DETERMINACION DE NITRATOS Y NITRITOS

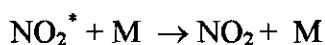
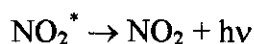
Se ha empleado un analizador Nitric Oxide Analyzer NOA™ 280 (Sievers Instruments. Boulder USA) que utiliza como señal la quimioluminiscencia que genera la reacción de NO con ozono. El fundamento del método es el siguiente:

### Reacción de quimioluminiscencia: NO + O<sub>3</sub>

La emisión de luz que acompaña la reacción de ozono y oxígeno con gases como el NO, NO<sub>2</sub>, CO y SO<sub>2</sub> está descrita desde los años sesenta<sup>291</sup>. Se encontró que el oxígeno reaccionaba con todos estos gases mientras que el O<sub>3</sub> reaccionaba de manera más eficaz con NO. Estas son las bases de la selectividad del ensayo de quimioluminiscencia para la determinación de NO. La reacción de NO con O<sub>3</sub> lleva a la formación de dióxido de nitrógeno, parte del cual se encontrará en estado excitado (NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>)<sup>291</sup>:



En estado excitado, los electrones son inestables y disipan energía para recuperar su original estado de estabilidad. El exceso de energía del NO<sub>2</sub><sup>\*</sup> hace que tienda a la estabilización por la interacción con otras moléculas de gas (M) o la liberación como fotón:



La luz emitida se encuentra dentro del espectro infrarrojo (~ 640-3000 nm) con un pico de intensidad a ~1100 nm. Los fotomultiplicadores empleados para detectar la luz emitida, son sensibles solo para longitudes de onda por encima de 900 nm. Aunque la suma de luz emitida por la reacción NO + O<sub>3</sub> está en el rango aún de 600-900 nm es suficiente para hacer del ensayo de quimioluminiscencia uno de los métodos más sensibles disponible para la medida de NO.



La reacción de quimioluminiscencia es rápida y tiene lugar a una baja energía de activación<sup>292</sup>. A diferencia del NO, otros óxidos de nitrógeno como el dióxido de nitrógeno, reaccionan más lentamente y requieren una energía de activación mayor<sup>292</sup>. Consecuentemente las señales producidas por NO no se afectan por NO<sub>2</sub>, aún cuando éste se encuentre a concentraciones elevadas<sup>293</sup>.

En 1970, Fontijn, Sabadell y Ronco utilizaron estos principios teóricos para construir el primer analizador de quimioluminiscencia aplicable a la medida de NO<sup>293</sup>. Ellos demostraron que la luz emitida era linealmente proporcional al contenido de NO de la muestra en un amplio rango y que éste no era interferido por NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CO, C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>O<sup>293</sup>.

### Analizador de quimioluminiscencia:

El esquema de funcionamiento de estos instrumentos se sintetiza en el siguiente esquema:



Fig M 9: fundamento básico del analizador de quimioluminiscencia

Consiste en una cubeta de reacción donde tiene lugar la reacción de quimioluminiscencia, un detector que mide la luz emitida y un integrador de señales. Debido a las especiales características de la reacción  $\text{NO} + \text{O}_3$  se requieren algunos requisitos adicionales:

- **Fotomultiplicador:**

Como el  $\text{NO}_2^*$  emite una luz infrarroja relativamente débil, el detector de elección para la reacción  $\text{NO} + \text{O}_3$  es un fotomultiplicador, debido a su sensibilidad a niveles bajos de luz en el espectro infrarrojo. En el fotomultiplicador, los fotones golpean una superficie fotosensible y el impacto libera electrones que son acelerados por un campo eléctrico a una superficie sensible a los electrones. Cada impacto de un electrón causa la emisión de varios electrones desde el primer dínodo hasta el segundo. Este paso es

repetido varias veces y finalmente los electrones son atraídos hacia el elemento terminal cargado eléctricamente, el ánodo. La amplificación de esta cascada es del orden de millones de electrones al ánodo por cada electrón emitido desde la superficie fotosensible<sup>294</sup>.

Además de su elevada sensibilidad, otra ventaja del fotomultiplicador frente al detector de luz convencional es la estabilidad de la corriente de fondo. A pesar de ello, existen factores que pueden alterarlo como la temperatura, la luz y el voltaje de las condiciones basales.

- **Temperatura:**

La corriente de fondo del fotomultiplicador es fuertemente dependiente de la  $T^a$ , se duplica por cada  $10^\circ \text{C}$  que se incremente la  $T^a$ <sup>294</sup>. Para reducir dicho ruido de fondo este analizador de quimioluminiscencia está equipado con un sistema de enfriamiento que mantiene la  $T^a$  del fotomultiplicador a  $-20^\circ\text{C}$ .

- **Vacío:**

Es esencial para el correcto funcionamiento de la técnica que se mantenga una presión reducida de  $\sim 1\text{-}15 \text{ mmHg}$  debido a lo siguiente:

- Evacúa los gases que pueden absorber energía de especies excitadas de  $\text{NO}_2^*$ , dando como resultado más moléculas de  $\text{NO}_2^*$  que emiten luz.
- El vacío estabiliza el NO eliminando oxígeno. El oxígeno rápidamente convierte el NO a  $\text{NO}_2$  que no produce luz medible en contacto con el ozono<sup>293</sup>.
- El gradiente de presión sirve como fuerza que conduce la muestra a la cubeta de reacción.

- **Flujo de gas:**

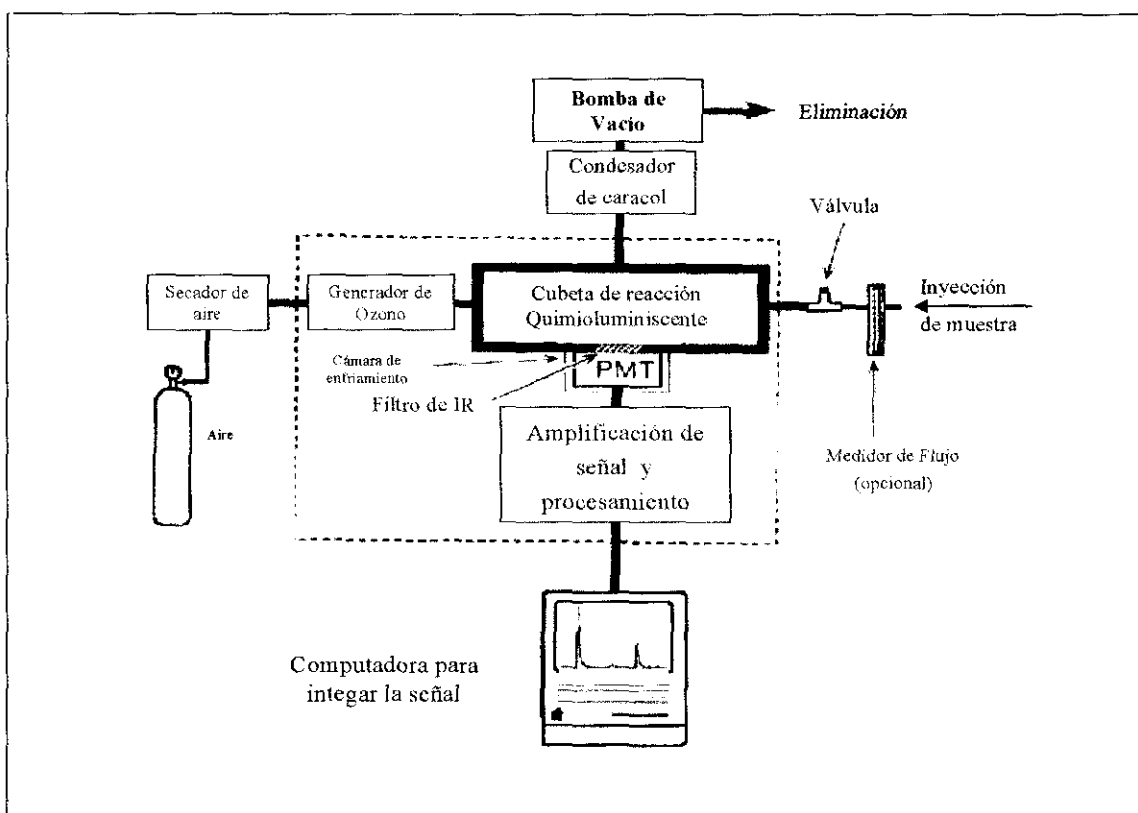
Para obtener resultados óptimos, tanto el flujo de muestra como el de gas de ozono debe ser constante<sup>294</sup>. El flujo de gas a través del generador de ozono se fija mediante el uso de un compresor, aire más seco que aire ambiental<sup>295</sup>. El ozono es

aportado en exceso, por lo que su consumo por la reacción con el NO es despreciable. El flujo de inyección de muestra puede influir, por lo que cada una de las determinaciones se realizaba por duplicado con el fin de confirmar que este efecto no tenía lugar.

- **Integración de la señal:**

El instrumento dispone de un contador de fotones integrado en el cual el usuario puede definir los intervalos de tiempo. Esta integración permite medir la intensidad de la señal. El cálculo se realiza considerando las áreas bajo la curva.

### Esquema del analizador de quimioluminiscencia:

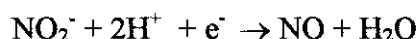


**Fig. M 10: Esquema del analizador de quimioluminiscencia:** Los nitratos y nitritos reaccionan con el ozono y la señal quimioluminiscente que se emite es integrada por una computadora que calcula la concentración a través de las áreas de los picos obtenidos. PMT: fotomultiplicador, IR: infrarrojo.

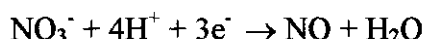
### **Aplicación para muestras líquidas:**

A temperatura ambiente el NO tiene un coeficiente de partición ~ 20. Esto significa que en un sistema que contiene ambos, gas y fluido, existe una proporción de gas 20 veces superior a la de líquido. Consecuentemente, cuando un espécimen de fluido corporal (no sometida in vivo al contacto con la fase gaseosa) es introducido en un sistema en el que el gas predomina sobre el líquido y es aspirado en el analizador de quimioluminiscencia, el NO que contiene la muestra escapa a la fase gaseosa mediante aceleración de la especie líquida con un flujo constante de un gas inerte (en nuestro caso el N<sub>2</sub>). El flujo de gas se mantiene constante en un valor ~ 8-10 mL/min mediante una válvula reguladora, lo que permite obtener resultados óptimos.

La muestra sometida a un agente reductor a pH ácido, los NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y se convierten en NO<sup>296</sup>. El proceso global que tiene lugar, se resume en la siguiente ecuación:



En condiciones más drásticas de reducción, no solo los nitritos sufren esta reacción sino que también los nitratos.



Para alcanzar estas condiciones se ha utilizado como agente reductor tricloruro de Vanadio III. A temperatura elevada (90°C), el vanadio es capaz de reducir NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, permitiendo la determinación conjunta de estas especies.

El cálculo de las concentraciones se realiza a través de una recta de calibrado realizada con soluciones acuosas de concentraciones conocidas de nitritos y nitratos. Debido a la linealidad de la técnica, podemos obtener valores de concentraciones mediante extrapolación en dicha recta de calibrado.

La medida de nitratos y nitritos por quimioluminiscencia es probablemente el método más sensible disponible en la actualidad<sup>296</sup>. Las señales no se ven afectadas por nitro y nitrosocompuestos<sup>296</sup>. La N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina y los nitrosotioles también producen señales quimioluminiscentes con los reactivos empleados para los nitratos y

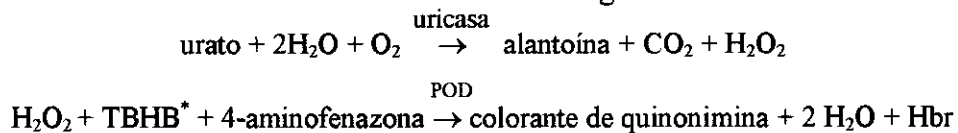
nitritos<sup>297</sup>. Por lo tanto, mediante esta técnica es posible evaluar todos los productos finales de la producción de NO.

## I) OTRAS DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

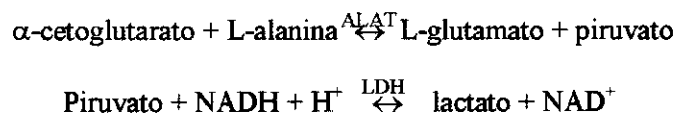
Además de la medida de nitratos, nitritos y nitrosotioles se realizaron una serie de determinaciones de carácter general con el fin de monitorizar los cambios bioquímicos producidos por la sepsis.

Las pruebas bioquímicas cuyos métodos analíticos se describen a continuación han sido realizadas en un autoanalizador automático *Hitachi 747* (Boehringer Mannheim), con la excepción del lactato que se ha realizado en un analizador *Cobas Integra* (Roche-Suiza):

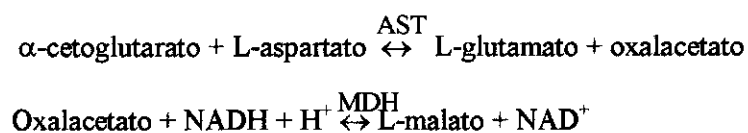
- **Urato:** Se ha medido ácido úrico sérico como parámetro, junto con urea y creatinina, que se eleva en caso de fallo renal y acidosis metabólica. El test empleado es un método colorimétrico enzimático<sup>298</sup> con el siguiente fundamento:



- **Alanina-aminotransferasa (ALT):** Parámetro específico de lesión hepática. El método utilizado ha sido el "Método standard optimado" de la Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie<sup>299</sup> cuyo fundamento es el siguiente:



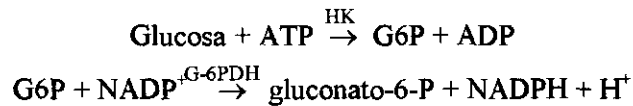
- **Aspartato aminotransferasa (AST):** Sus niveles plasmáticos aumentan en caso de fallo hepático, oclusión vascular mesentérica y otras alteraciones de origen extrahepático. El método utilizado para su determinación ha sido el "Método standard optimado" de la Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie<sup>299</sup> cuyo fundamento es el siguiente:



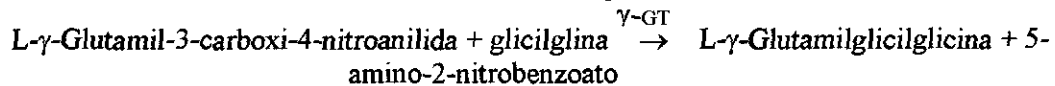
También es de utilidad para estimar el tipo de lesión hepática el cociente AST/ALT ya que éste se incrementa en caso de colestasis intrahepática y desciende en la extrahepática.

- **Bilirrubina Directa (BD):** Indicador de lesión hepatobiliar fundamentalmente de tipo obstructivo. Se ha utilizado el *método de Jendrassik*<sup>300</sup> que se basa en la formación de un colorante azoico que tiene lugar cuando la bilirrubina directa reacciona con ácido sulfanílico diazotado.
  
- **Bilirrubina Total (BT):** Es igualmente un indicador de lesión hepatobiliar. Un incremento pronunciado de BT sin que éste de acompañe de un aumento paralelo de BD es indicativo de alteración hepatocelular más que de obstrucción extrahepática. El método empleado ha sido el *método DPD* para la determinación de bilirrubina total<sup>301</sup> en el cual la bilirrubina total se copula con un compuesto de diazonio a la correspondiente azobilirrubina. Con un detergente se libera la bilirrubina indirecta.
  
- **Calcio:** Para determinar el calcio se ha utilizado el método *o-cresoftaleína-complexona*<sup>302</sup> que se fundamenta en la formación de un complejo violeta cuya máxima absorción ocurre a una longitud de onda de 546nm., cuando el calcio reacciona con o-cresoftaleína-complexona en solución alcalina.
  
- **Creatinina:** Sus niveles aumentan en caso de fallo renal agudo, alteración que puede producirse en casos graves de shock séptico y en síndrome de fallo multiorgánico. Se ha medido por el *método de Jaffé modificado, cinético sin desproteinización*<sup>303</sup> según el cual la creatinina forma un complejo coloreado con ácido pícrico y se mide la velocidad de desarrollo del color a una longitud de onda de 505 nm como punto de máxima absorción y a 570 nm en el que aparece otro máximo de absorbancia secundario.
  
- **Fósforo inorgánico:** Aumenta su concentración sérica en alteraciones de tipo isquémico, si se eleva por encima del 25% del nivel basal puede ser indicativo de lesión intestinal aguda, fallo renal agudo y acidosis metabólica. El método empleado es la *“reacción de molibdato”*<sup>304</sup> basado en la formación de un complejo de fosfomolibdato de amonio en solución ácida.

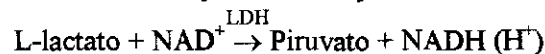
- **Glucosa:** El método empleado es el denominado como “hexocinasa/G6P-DH”<sup>305</sup> basado en la medida del cambio de absorbancia debido a las reacciones acopladas:



- **L-γ-Glutamiltransferasa (γGT):** Indicador no específico de colestasis. El test empleado mide la actividad enzimática mediante la siguiente reacción<sup>306</sup>:

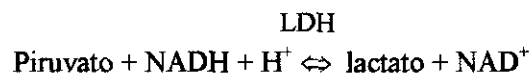


- **Lactato plasmático:** Indicador de hipoxia tisular. El método empleado es una modificación del método de Marbach y Weil<sup>307</sup> cuyo fundamento es el siguiente:

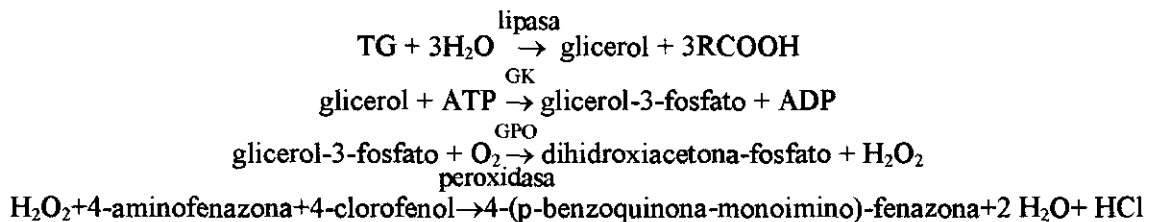


La absorbancia del NADH es proporcional al lactato existente en la muestra.

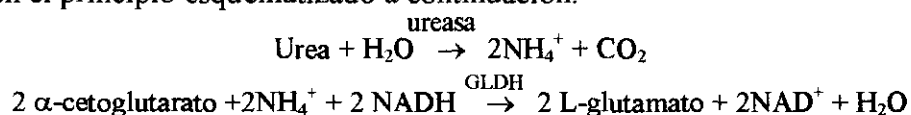
- **Lactatodeshidrogenasa (LDH):** Se ha utilizado el “método standar optimado” de la Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie<sup>308</sup> basado en el siguiente equilibrio:



- **Triglicéridos (TG):** La hipertrigliceridemia es una de las características metabólicas de la sepsis debido a la importante demanda energética que implica movilización de grasas. Se determina mediante hidrólisis enzimática de los TG y posterior detección del subsiguiente glicerol formado (reacción colorimétrica)<sup>309</sup>:



- **Urea:** Este parámetro se altera en múltiples patologías entre las que destacan las alteraciones hepáticas y renales. El método empleado es el descrito por Neumann<sup>310</sup> que se basa en el principio esquematizado a continuación:



## J) AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA

Se extrae sangre arterial procedente del ventrículo izquierdo en animales anestesiados utilizando citrato como anticoagulante. Se aísla el paquete de hematíes por centrifugación a 800g durante 10 min y se lava con suero fisiológico; este proceso de centrifugado y lavado se realiza tres veces consecutivas. Posteriormente los hematíes son lisados adicionando agua desionizada en una proporción 4 veces superior al volumen del paquete eritrocitario. Inmediatamente, la hemoglobina se purifica mediante su paso a través de columnas Sephadex G-25<sup>253</sup>. Puesto que la solución de hemoglobina resultante es hipotónica, se añade solución saturada de cloruro sódico hasta obtener isotonicidad. Las medidas de osmolaridad se realizan por medida del descenso crioscópico en un analizador 3MO micro-osmometer Advanced-Instruments, Massachusetts, USA .

Puesto que la mayor parte de las reacciones de transnitrosilación del equilibrio del glutation con la SNOHb tienen lugar predominantemente con SNO-Hb(Fe<sup>III</sup>) más que con SNO-Hb(Fe<sup>II</sup>); es importante la determinación del tipo de Hb administrada. Para ello, se ha utilizado un Coxímetro Synthesis 25, Instrumentation Laboratory, Cidra, Puerto Rico.

## K) ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

La técnica utilizada permite visualizar en tejidos fijados en parafina la presencia de nitrotirosina ,lo que permite estimar la toxicidad tisular mediada por ONOO<sup>-</sup>.

### Fundamento de la técnica:

La nitrotirosina tisular (antígeno=Ag) se une específicamente al anticuerpo primario anticuerpo antinitrotirosina (Upstate Biotechnology, Antinitrotyrosine polyclonal: 06-284). Una vez producida la unión, el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario por una zona diferente a la que fija el antígeno. Este anticuerpo secundario es afín al complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa, de tal forma que al



añadir un colorante en su estado reducido (incolore) éste se oxida produciendo una coloración de color marrón-pardo.

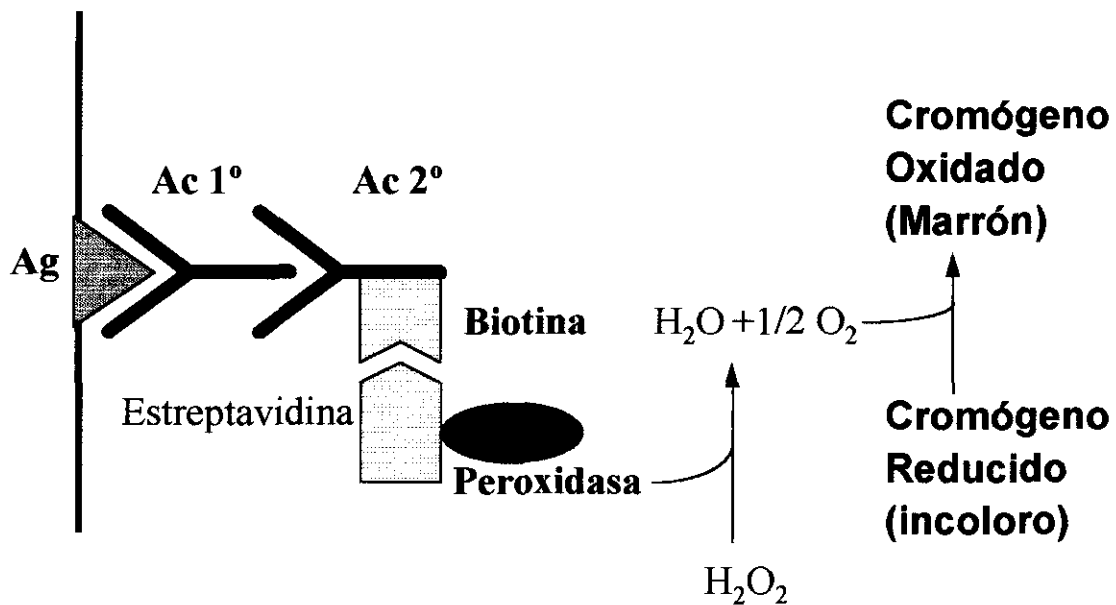


Fig M 11: Esquema del fundamento del método inmunohistoquímico. Ag = antígeno, Ac 1º = anticuerpo primario, Ac 2º = anticuerpo secundario.

#### Procedimiento:

Se han tomado muestras de:

- Segmento de intestino delgado.
- Biopsia de pulmón derecho.
- Biopsia de hígado.
- Biopsia de riñón derecho.

Todas las muestras fueron fijadas en formaldehído al 5% y la inclusión se realizó en parafina; posteriormente se realizaron cortes de 4 micras de espesor.

Antes de proceder a la tinción inmunohistoquímica se han realizado pruebas con la finalidad de hallar la concentración de anticuerpo primario óptima. Estas pruebas se han realizado comparando diferentes concentraciones de anticuerpo con muestras de tejido obtenidas al comienzo del experimento sometiéndolas a concentraciones decrecientes hasta que el resultado fuera negativo. Una vez halladas dichas concentraciones, las muestras de cada uno de los tejidos junto con los controles negativos han sido procesadas todas a la vez, con el fin de evitar heterogeneidad en la tinción.

Las muestras se han desparafinado mediante inmersiones sucesivas del tejido en xileno. El procedimiento inmunohistoquímico se ha realizado en un analizador automático Tech Mate Horizon, DAKO, LJI Biosystems que realiza los procesos de:

- 1º. Hidratación.
- 2º. Bloqueo de peroxidadas endógenas.
- 3º. Incubación previa con suero normal.
- 4º. Incubación con el anticuerpo primario.
- 5º. Incubación con anticuerpo secundario.
- 6º. Aplicación del complejo Avidina-Biotina.
- 7º. Tinción con cromógeno.

Una vez realizada la técnica, las muestras de tejido han sido observadas con un microscopio óptico. Para realizar comparaciones en el grado de tinción de los diferentes grupos, se han establecido previamente una serie de criterios para cada uno de los tejidos que se detallarán a continuación.

Simultáneamente, se ha realizado un estudio histológico utilizando la tinción hematoxilina-eosina para valorar alteraciones histológicas.

#### **Criterios para evaluar el grado de tinción y lesión tisular:**

##### **▪ Intestino:**

###### Evaluación histológica:

0 = Mucosa normal.

I = Vacuolas en el espacio subepitelial en la punta de las vellosidades.

II = Espacio subepitelial que afecta al 25% de la vellosidad.

III = Espacio subepitelial que afecta al 50% de la vellosidad.

IV = Espacio subepitelial que afecta al 75% de la vellosidad.

V = Vellosidad denudada.

VI = Afectación de vellosidades y criptas.

VII = Afectación de toda la mucosa.

VIII = Afectación de toda la pared.

Nitrotirosina:

- 0 = No tinción.
- 1 = Tinción leve y/o focal en citoplasma.
- 2 = Tinción moderada en todo el citoplasma.
- 3 = Tinción severa en todo el citoplasma.

El estudio se ha realizado en:

- 50 células ganglionares de los plexos submucosos y mioentéricos.
- Epitelio de revestimiento superficial o de las criptas en 5 vellosidades intersticiales.
- Células musculares de la capa muscular de las arterias.
- Endotelio en los capilares.

Todos los resultados obtenidos se han expresado en tanto por 3, con el fin de poder establecer comparaciones entre los diferentes tipos celulares.

▪ **Pulmón:**

Se ha evaluado:

- Contenido alveolar: presencia de leucocitos polimorfonucleares, hematíes, histocitos y existencia de edema.
- Tabiques alveolares: dilatación capilar, presencia de edema y células inflamatorias.

La graduación ha sido: 0 = no lesión, I = lesión leve, II = lesión moderada, III = lesión severa.

▪ **Hígado:**

Evaluación histológica:

- Congestión: dilatación sinusoidal y de vena central: 0 = no lesión, I = lesión leve, II = lesión moderada, III = lesión severa.
- Presencia de polimorfonucleares: 0 = no presencia, I = cantidad pequeña, II = cantidad moderada.
- Necrosis del hepatocito: 0 = no necrosis, I = necrosis focal, II = necrosis moderada, III = necrosis severa.
- Presencia de trombos: 0 = no existen, I = escasos (de 1-3 vasos), II = moderados (de 4-6 vasos), III = severo (más de 7 vasos).

La graduación ha sido: 0 = no lesión, I = lesión leve, II = lesión moderada, III = lesión severa.

#### Nitrotirosina:

Se ha estudiado la tinción en hepatocitos y células epiteliales de los conductos, las células de Kupffer, las células musculares de los vasos y las células inflamatorias. La valoración de la positividad ha sido: 0 = no tinción, I = tinción leve, II = tinción moderada, III = tinción severa.

- **Riñón**

Se han valorado las lesiones en glomérulos, túbulos del intersticio y vasos.

## L) **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El estudio estadístico empleado es un análisis de la varianza (ANOVA) para un modelo de medidas repetidas de acuerdo con un modelo con un factor intraserie (ej: las tres dosis de Hb) y dos factores entre series: tratamiento con Hb (incluyendo dos niveles: tratados-no tratados) y sepsis incluyendo dos niveles (sepsis- no sepsis).

- Hipótesis nula: las muestras estudiadas presentan igualdad de medias para la variable dependiente.
- Estadístico de contraste: Se ha utilizado el “estadístico  $F$ ” como criterio diferenciador entre los grupos. Si el valor  $p$  asociado al estadístico de contraste es menor que  $\alpha$  se ha rechazado la hipótesis nula con un nivel de significación  $\alpha$ .
- Nivel de significación  $\alpha$ :  $p=0,05$  para las diferencias significativas y NS para las no significativas.

La diferencia entre los grupos se ha confirmado mediante la prueba de  $t$  de Student para datos no pareados con la prueba de corrección de Bonferroni.

El test de Fisher se ha utilizado para determinar qué punto particular difería significativamente del valor basal en medidas repetidas ANOVA.

## 2. MODELO CLÍNICO DE SEPSIS GRAVE Y SHOCK SÉPTICO

En el estudio clínico se estima la validez de los niveles de nitrosóxido como *parámetro potencialmente útil para monitorizar pacientes sépticos en los cuales el NO y sus productos derivados son mediadores responsables del deterioro hemodinámico y celular. Se han estudiado pacientes con diferente grado de evolución séptica atendiendo a criterios tanto hemodinámicos, hematológicos y bioquímicos.*

### A. Pacientes y criterios de inclusión

- **SEPSIS:** 12 enfermos afectados de sepsis que cumplían los criterios de presencia de un foco infeccioso conocido (por ejemplo: neumonía, peritonitis, etc.) así como la constatación de tres de los siguientes signos: taquicardia ( $>90$  latidos/min en ausencia de bloqueo beta-adrenérgico), taquipnea ( $>20$  respiraciones/min o necesidad de ventilación mecánica), fiebre o hipotermia (temperatura  $>38,3^{\circ}$  o  $<35,6^{\circ}$ ), leucocitosis o leucopenia ( $>16000$  células/mm<sup>3</sup> o  $<4000$  células/mm<sup>3</sup>). La calificación de "grave" viene determinada por la presencia de al menos uno de los siguientes criterios de perfusión inadecuada de órganos: relación  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 280$  (sin otra enfermedad pulmonar o cardíaca que lo explique), oliguria ( $<0,5$  ml/kg.hr durante al menos 1 hora), o hiperlactatemia ( $>2$  mmol/L).
- **SHOCK SÉPTICO:** 15 enfermos afectados de shock séptico. Estos enfermos reunían los criterios para el diagnóstico de sepsis grave definidos previamente, junto con la existencia de shock circulatorio caracterizado por presión arterial sistólica  $<90$  mm Hg, o 40 mm Hg por debajo del valor basal que no respondía a la administración de líquidos y precisaban tratamiento con agentes presores.
- **SHOCK CARDIOGÉNICO:** 3 enfermos afectados de shock cardiogénico en los que el origen de shock circulatorio no era infeccioso.
- **GRUPO CONTROL:** 14 sujetos sanos.

**B. Protocolo de estudio en la sepsis clínica**

En todos los enfermos se determinaban los niveles de nitrosotioles en el momento del ingreso o bien cuando éstos eran diagnosticados de sepsis o shock séptico en la Unidad de Cuidados Intensivos.

En el momento de la toma de muestra para la determinación de RSNOs, se realizaba un estudio hemodinámico que incluía la medida de la PAM, la PAP y el IC. Igualmente se realizaba un estudio de disfunción de órganos para el cual se establecían los siguientes criterios:

- Disfunción pulmonar:  $pO_2/FiO_2 < 200$
- Disfunción hepática: bilirrubina total  $> 2$  mg/dL.
- Disfunción gastrointestinal: no tolerancia a la nutrición parenteral.
- Disfunción hematológica:
  - a) Tiempo de protrombina  $< 50\%$
  - b) Tiempo de cefalina  $> 50$  sg.
  - c) Número de plaquetas:  $< 100.000$  plaquetas/ $\mu$ L.

## ***RESULTADOS***

Como se ha comentado en apartados previos, en este experimento se han realizado medidas de diversos parámetros, con la finalidad de estudiar el comportamiento de la sepsis, fundamentalmente en aspectos como la producción de NO y el desarrollo de acidosis intramucosa; la acción de la Hb como potencial resucitador del shock y el GSH como molécula que interacciona con el NO y la Hb. Por ello, los resultados obtenidos pueden englobarse en cinco grandes bloques cada uno de ellos correspondiente a los objetivos fundamentales de este estudio:

- Cambios producidos por la sepsis:
  - Efectos hemodinámicos.
  - Cambios bioquímicos.
  - Estimadores de la producción de NO.
- El daño tisular mediado por ONOO<sup>-</sup> en la sepsis.
- Efectos de la Hb frente a resucitación fluidica convencional.
  - Valoración de la lesión tisular generada por la Hb
- Efecto dosis-respuesta de la Hb.
- Repercusión vascular de la interacción Hb-GSH en cuanto afinidad por el NO.

## 1. EFECTOS DE LA SEPSIS

El diseño de nuestro experimento tiene como uno de sus objetivos el reproducir un estado de sepsis, de tal forma que se cumplan los criterios diagnósticos expuestos en el apartado de la introducción. Para ello se ha realizado un estudio hemodinámico, bioquímico y hematológico de las alteraciones producidas. Además de los criterios diagnósticos, se han valorado otros aspectos de relevancia en la patología séptica que tienen relación directa con la finalidad de este estudio como son: la estimación de la producción de NO, la valoración del daño mediado por ONOO<sup>-</sup> y la acidosis intramucosa.

### 1.1) EVOLUCIÓN HEMODINÁMICA DE LA SEPSIS

#### A) FRECUENCIA CARDIACA (FC)

Durante el tiempo en el que transcurre el experimento se observa un cambio



significativo en la evolución en los valores medios de FC (Tiempo:  $p = 0,003$ ). Como puede observarse en la figura, la sepsis provoca un incremento significativo de la FC (Tiempo \* sepsis:  $p < 0,0001$ ). La diferencia observada en el comportamiento del grupo séptico con respecto al control es significativa en la tercera hora de la evolución ( $p = 0,0419$ ).

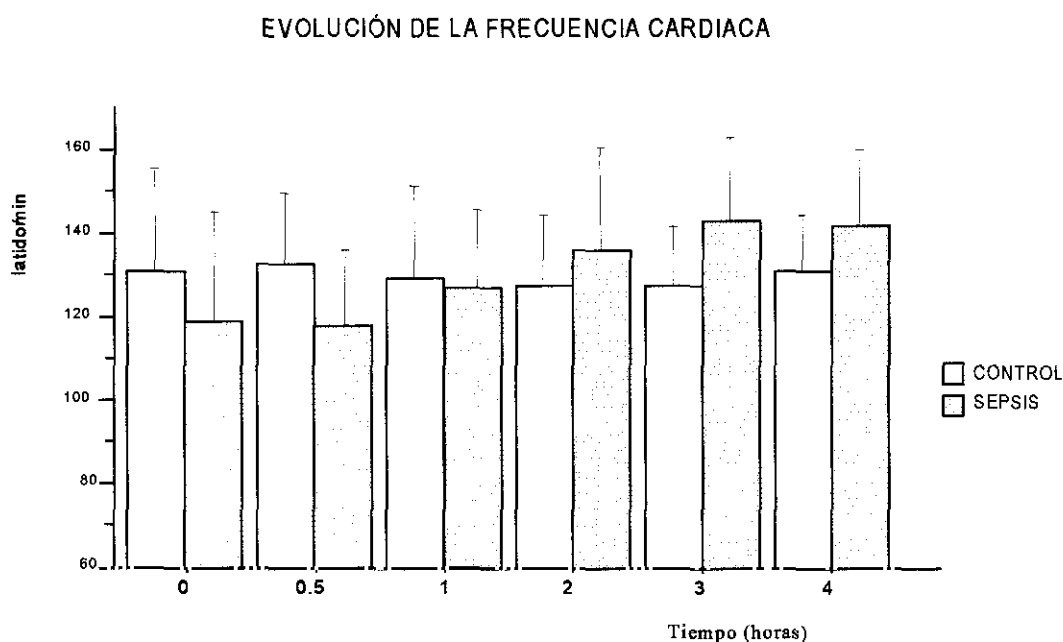


Fig R1: Cambios que experimenta la FC durante la evolución séptica: Se observa que la FC sufre un incremento en el grupo séptico [ ]

## B) PRESIÓN ARTERIAL MEDIA (PAM)

La PAM experimenta cambios significativos durante las cuatro horas de evolución (Tiempo:  $p < 0,0001$ ). La variación que tiene lugar en el grupo séptico es significativamente diferente de la del grupo control (Tiempo \* sepsis:  $p < 0,0001$ ). En el grupo séptico tiene lugar un intenso y progresivo descenso de PAM, siendo máximo en la cuarta hora. La diferencia con respecto al grupo control es significativa a partir una hora posterior a la inducción de la sepsis (hora 1:  $p = 0,04$ ) y se mantiene esta diferencia significativa durante las horas posteriores de evolución.

## EVOLUCIÓN de la PRESIÓN ARTERIAL MEDIA

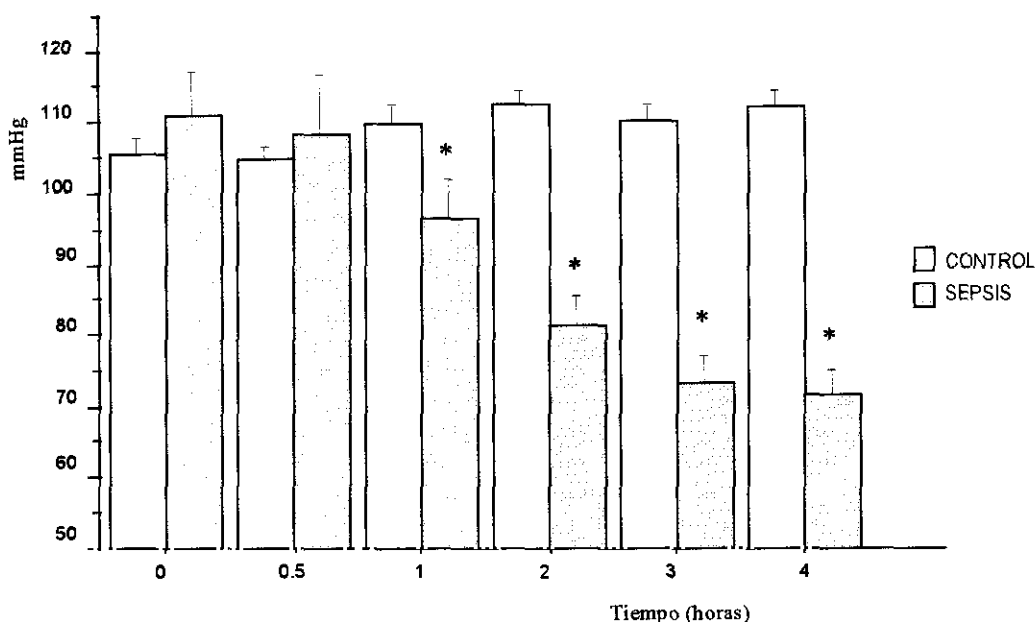


Fig R2: Cambios que experimenta la PAM durante la evolución séptica: Se observa que la PAM sufre un descenso significativo (\*) en el grupo séptico a partir de la primera hora de evolución.

### C) PRESIÓN ARTERIAL PULMONAR (PAP)

Al igual que sucede con la PAM, durante el desarrollo del modelo experimental se producen modificaciones significativas de la PAP ( $p < 0,0001$ ). En el grupo séptico se producen cambios que difieren significativamente del grupo control, en el cual los valores medios de PAP se mantienen constantes. Al comienzo del experimento el grupo séptico presenta una media de PAP de  $20,8 \pm 6,05$  mmHg que se incrementa bruscamente a  $41,47 \pm 12,4$  mmHg durante la infusión del inóculo (hora 0,5:  $p < 0,0001$ ). Este importante aumento no se mantiene en esos valores una vez finalizada la infusión bacteriana, sino que después de una hora la PAP desciende, a pesar de lo cual presenta unos valores medios significativamente superiores (ver anexo estadístico) a los correspondientes en el grupo control. En las tres últimas horas del transcurso del proceso séptico se observa un incremento progresivo de la PAP.

PRESIÓN de la ARTERIA PULMONAR

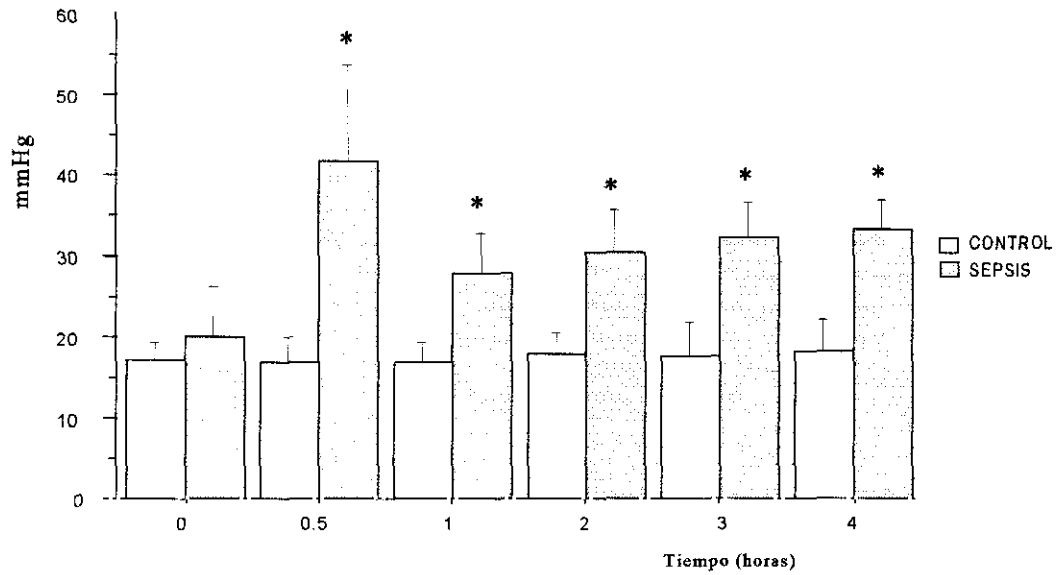


Fig R3: Cambios que experimenta la PAP durante la evolución séptica: Se observa que la PAP sufre un importante incremento en el momento de la infusión séptica (hora 0,5) y se mantiene en valores significativamente superiores (\*) en el grupo séptico.

D) ÍNDICE CARDIACO (IC)

En nuestro modelo experimental la sepsis no induce alteraciones significativas sobre los valores medios de IC (Tiempo \* sepsis: p NS).

EVOLUCIÓN del ÍNDICE CARDIACO

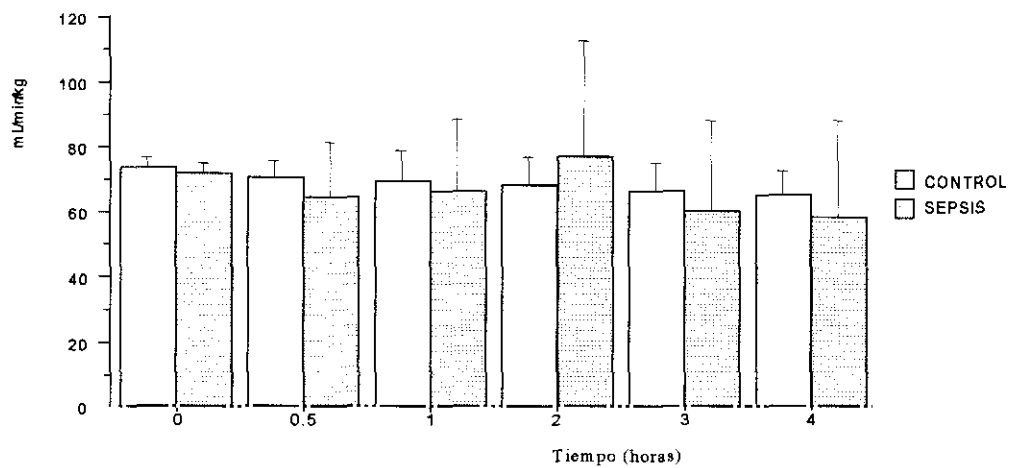


Fig R4: Cambios que experimenta la IC durante la evolución séptica: Se observa que el IC no sufre cambios significativos en la sepsis.

### E) RESISTENCIA VASCULAR SISTÉMICA (RVS)

La RVS experimenta cambios significativos a lo largo del experimento. Como podemos observar en la figura, el comportamiento que sufre la RVS en el grupo séptico difiere sustancialmente de la del grupo control (Tiempo \* sepsis:  $p = 0,01$ ). En el grupo séptico inicialmente se observa una cierta tendencia aunque no significativa al incremento de la RVS coincidente con el momento de la infusión bacteriana. Posteriormente, se produce un descenso significativo de la RVS que se mantiene hasta el final del experimento, siendo significativas las diferencias con respecto al grupo control en la hora 2 y 3 de evolución.

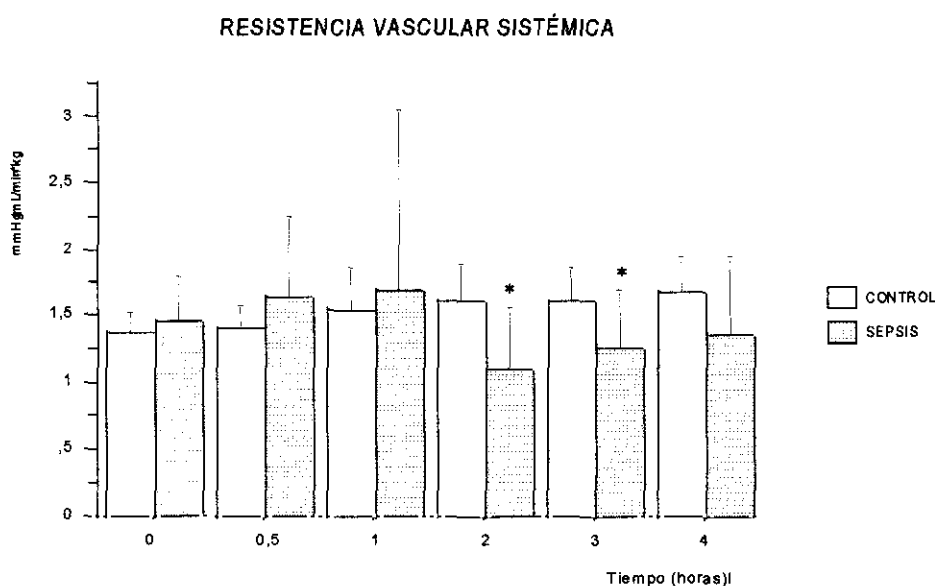


Fig R5: Cambios que experimenta la RVM durante la evolución séptica: Se observa que la RVM desciende en la sepsis  siendo significativas las diferencias (\*) durante las horas 2 y 3 de evolución.

### F) FLUJO MESENTÉRICO (Qmes)

La sepsis produce una intensa disminución del Qmes (Tiempo\*sepsis:  $p = 0,0001$ ). Esta diferencia con respecto al grupo control comienza a manifestarse desde el momento de la infusión bacteriana (hora 0,5  $p = 0,001$ ) y el descenso se acentúa progresivamente a lo largo del proceso séptico. Como puede observarse en la figura, durante las horas 1,2,3 y 4 de evolución, las diferencias entre ambos grupos son estadísticamente significativas (ver anexo estadístico). Es decir, el Qmes comienza a descender desde que se produce la

infusión del inóculo.

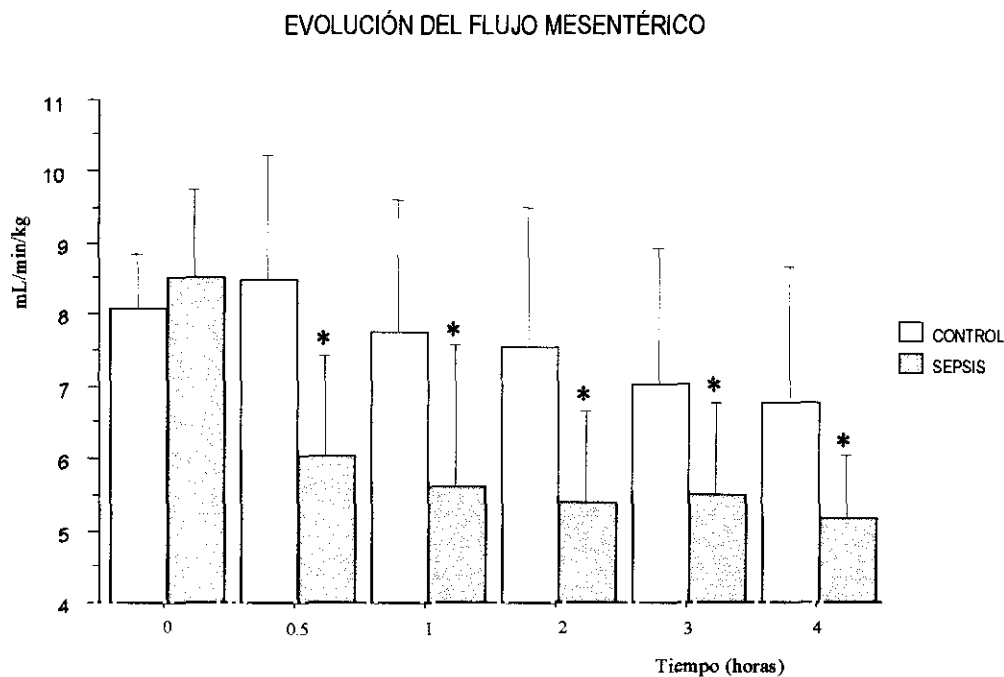


Fig R6: Cambios que experimenta el Qmes durante la evolución séptica. Se observa que el Qmes desciende de manera significativa (\*) desde el momento de la inducción de la sepsis (0,5 horas).

### G) FLUJO PORTAL (Qp)

De forma análoga a lo que sucede con el Qmes, la sepsis produce un descenso significativo del Qp (Tiempo \* sepsis:  $p=0,0001$ ). Esta diferencia con respecto al grupo control es significativa a partir del momento de la infusión bacteriana (ver significaciones en el anexo estadístico). En el grupo séptico se produce un descenso en el Qp de  $16,12 \pm 2,04$  mL/min/kg a  $9,3 \pm 2,2$  mL/min/kg en el momento final del transcurso de la sepsis.

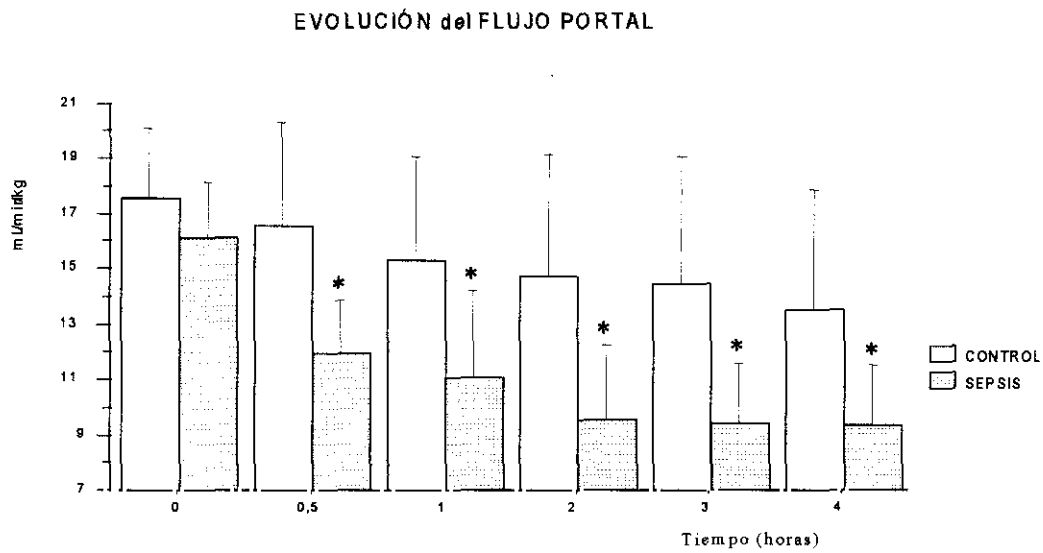


Fig R7: Cambios que experimenta el Qp durante la evolución séptica: Se observa que el Qp desciende de manera significativa (\*) desde el momento de la inducción de la sepsis (0,5 horas).

**G) DISTRIBUCIÓN DE FLUJO MESENTÉRICO (% respecto al flujo total)**

La proporción de flujo total que corresponde a la arteria mesentérica sufre a lo largo del periodo séptico variaciones casi significativas (tiempo \* sepsis:  $p=0,056$ ). En la figura podemos observar que a lo largo del desarrollo séptico en los que existen diferencias en la ratio  $Q_{mes}/Q_{total}$ .

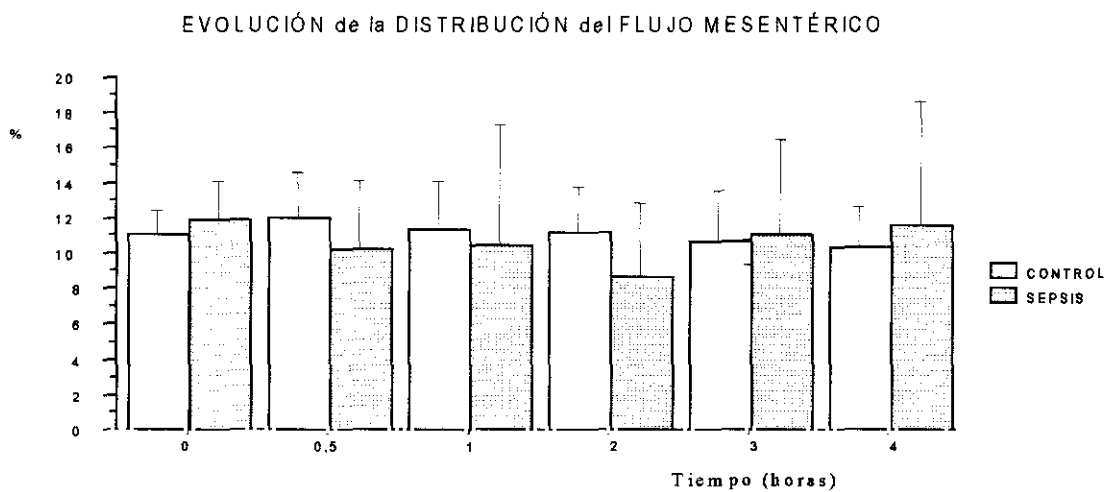


Fig R8: Cambios que experimenta la ratio  $Q_{mes}/Q_{total}$  durante la evolución séptica: La ratio  $Q_{mes}/Q_{total}$  experimenta cambios próximos a la significación durante la sepsis.

## H) DISTRIBUCIÓN DE FLUJO PORTAL (% respecto al flujo total)

La proporción de flujo total que corresponde a la vena porta no sufre a lo largo del periodo séptico variaciones significativas (tiempo \* sepsis:  $p = NS$ ).

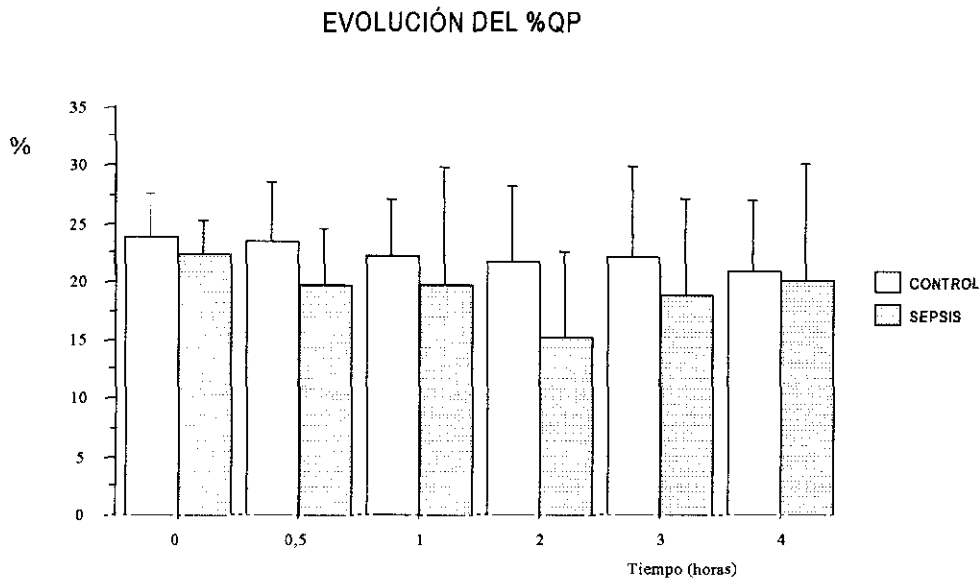


Fig R9: Cambios que experimenta la ratio  $Q_p/Q_{total}$  durante la evolución séptica: Se observa que la ratio  $Q_p/Q_{total}$  experimenta cambios significativos durante la sepsis .

## I) RESISTENCIA VASCULAR MESENTÉRICA

La RVM experimenta cambios significativos durante la evolución (Tiempo \* RVM:  $p = 0,0001$ ). En el grupo séptico se observa inicialmente un incremento de la RVM coincidente con el momento de la infusión bacteriana (0,5 horas) alcanzando valores  $1,68 \pm 1,3$  mmHg/mL/min\*kg y posteriormente se produce un descenso importante hasta valores de  $1,26 \pm 0,4$  mmHg/mL/min\*kg que se mantienen hasta el final del experimento.

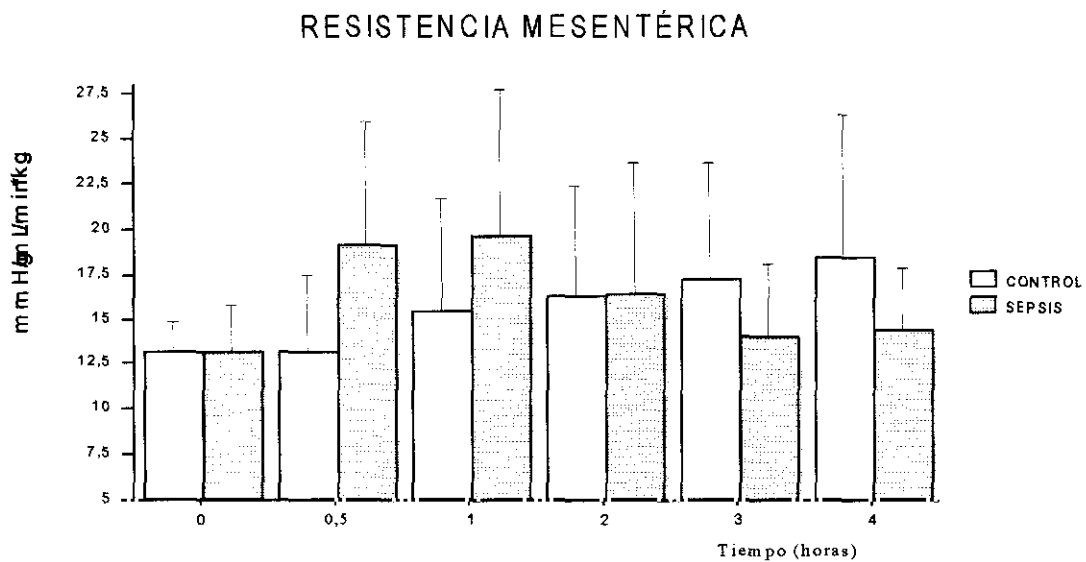


Fig R10: Cambios que experimenta la ratio RVM durante la evolución séptica: Se observa que la evolución de la sepsis difiere de la del grupo control. En el primer periodo de evolución se incrementa y después desciende.

Los efectos hemodinámicos provocados por la sepsis pueden sintetizarse en lo siguiente:

**PERFIL HEMODINÁMICO DE ESTE MODELO DE SEPSIS:**

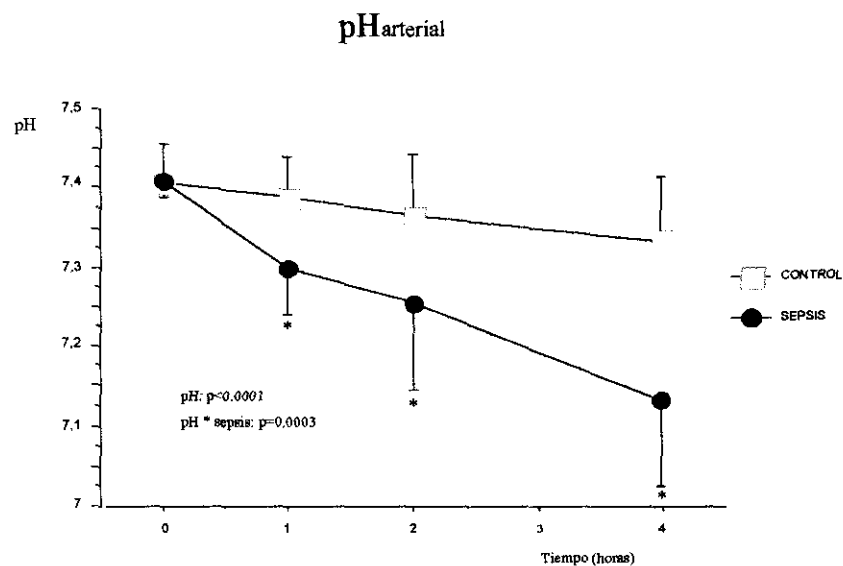
- Incremento de la FC.
- Descenso de la PAM.
- Incremento de la PAP.
- Mantenimiento del IC.
- Incremento inicial de la RVS con descenso en las últimas horas.
- Descenso pronunciado de Qmes y Qp.
- Alteración en la distribución de Qp.
- Incremento inicial de la RVM con descenso en las últimas horas.



## 1.2) CAMBIOS BIOQUÍMICOS EN LA SEPSIS

### A) pH

La acidosis es una de las alteraciones más relevantes en el enfermo séptico. En nuestro modelo se ha monitorizado el pH en estado basal y después de una, tres y cuatro horas del inicio del estímulo séptico. El pH medio inicial en el grupo control ha sido de  $7,41 \pm 0,05$  y en el grupo séptico  $7,41 \pm 0,02$ . A lo largo de las cuatro horas del experimento se observa una diferencia significativa en la evolución (Tiempo:  $p < 0,0001$ ). Esta evolución es significativamente diferente en el caso del grupo séptico (Tiempo \* sepsis:  $p < 0,0001$ ), donde se observa un descenso del pH medio de  $7,41 \pm 0,01$  al comienzo del experimento hasta  $7,13 \pm 0,03$  en la cuarta hora.

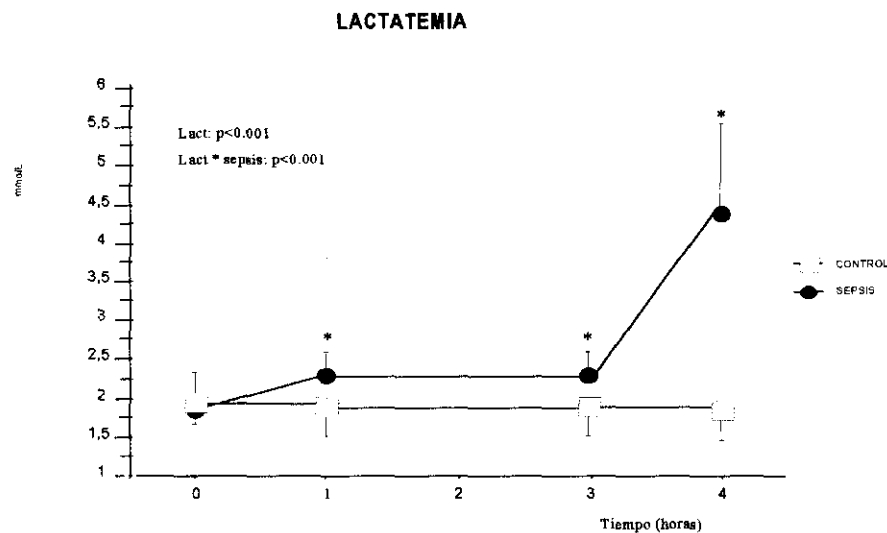


**Fig R11: Cambios que experimenta el pH arterial durante la evolución séptica:** Se observa que el pH desciende en la sepsis (●); siendo significativa la diferencia (\*) con respecto al grupo control (□) a partir de la primera hora.

### B) LACTATEMIA

Al comienzo del experimento el grupo control presentaban unos valores medios de  $1,95 \pm 0,4$  mmol/L y el grupo séptico  $1,8 \pm 0,2$  mmol/L. Se observa una variación de la lactatemia a lo largo de las cuatro horas del experimento (Tiempo:  $p < 0,0001$ ). En el grupo séptico esta evolución es significativamente diferente a la del grupo control (Tiempo \* sepsis:  $p < 0,0001$ ), de tal forma que la lactatemia media final en el grupo control es de 1,87

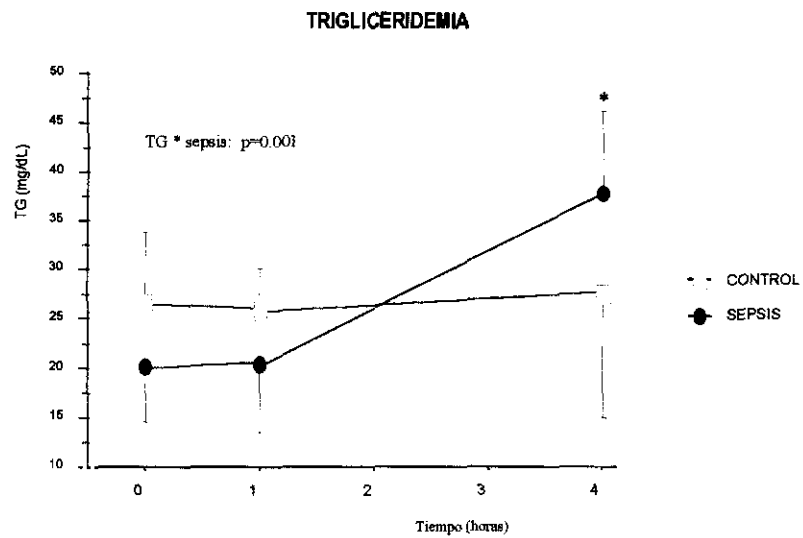
$\pm 0,45$  mmol/L mientras que en el grupo séptico es de  $4,4 \pm 1,2$ . Esta diferencia entre el grupo control y el séptico es significativa en la tercera ( $p=0,02$ ) y cuarta hora ( $p<0,0001$ ) del experimento.



**Fig R12: Cambios que experimenta la lactatemia durante la evolución séptica:** Se observa que se incrementa en la sepsis (●); siendo significativa la diferencia (\*) con respecto al grupo control (□) a partir de la primera hora.

### C) TRIGLICERIDEMIA

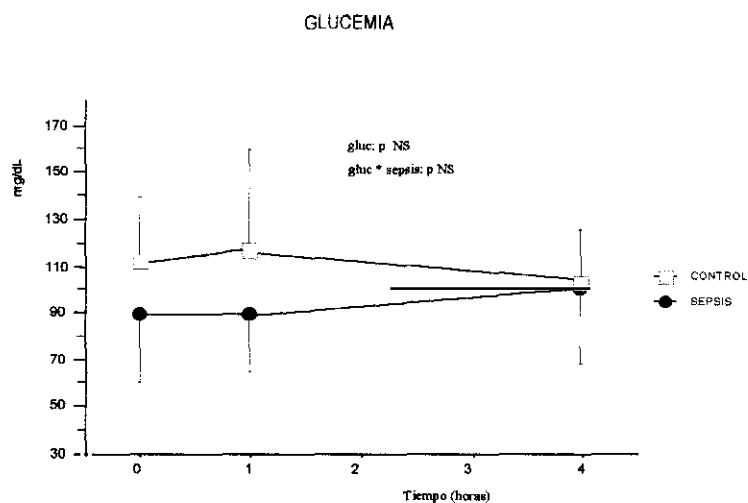
Se ha observado una diferencia significativa en las concentraciones de TG en el transcurso del experimento (Tiempo:  $p=0.0002$ ). El grupo séptico presenta un incremento significativo de la trigliceridemia con respecto al grupo control (Tiempo \* sepsis:  $p=0,0011$ ). Las concentraciones medias basales del grupo control y séptico son  $26,6 \pm 7,3$  mg/dL y  $20,16 \pm 5,8$  mg/dL respectivamente. Después de cuatro horas de evolución la concentración sérica en el grupo control fue de  $27,5 \pm 12,7$  mg/dL mientras que en el grupo séptico ascendió a  $37,75 \pm 8,49$  mg/dL. Esta diferencia entre ambos grupos es significativa a la hora uno de evolución ( $p=0,037$ ) y en la hora cuatro ( $p=0,03$ ).



**Fig R13: Cambios que experimenta la trigliceridemia durante la evolución séptica:** Se observa que se incrementa en la sepsis (\*), siendo significativa la diferencia (\*) con respecto al grupo control (□) en la cuarta hora.

#### D) GLUCEMIA

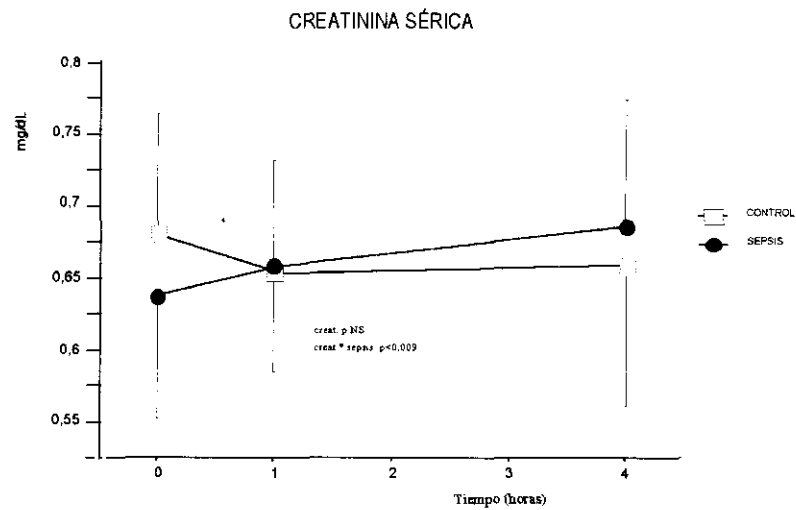
No se observan cambios significativos en la glucemia durante la evolución del experimento (Tiempo: p NS). Tampoco existe diferencia significativa en la evolución de la glucemia entre el grupo control y el grupo séptico (Tiempo \* sepsis: p NS).



**Fig R14: Cambios que experimenta la glucemia durante la evolución séptica:** No se observan incrementos significativos en la sepsis (\*).

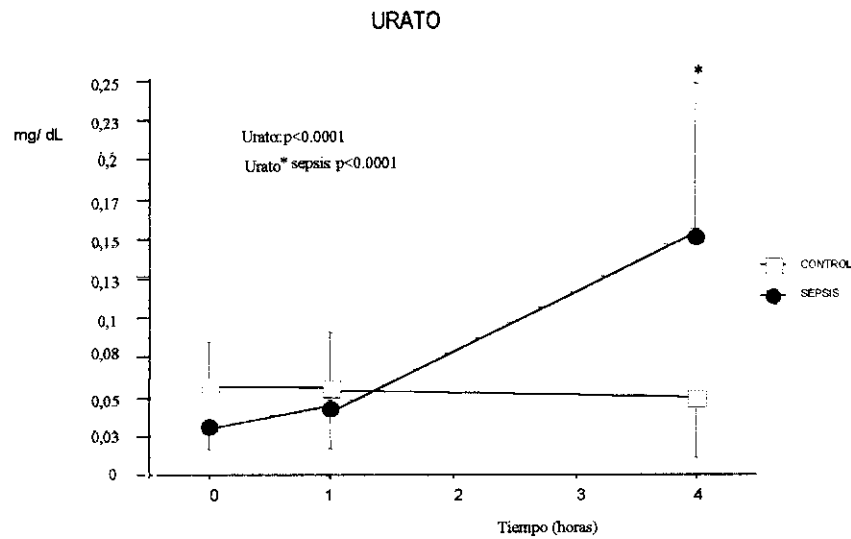
## f) CREATININA

La creatinina sérica aumenta de forma significativa a lo largo del experimento en el grupo séptico (Tiempo \* sepsis:  $p=0,0095$ ). El incremento que se produce es de  $0,63 \pm 0,08$  mg/dL al inicio del experimento a  $0,68 \pm 0,09$  mg/dL al final, mientras que en el grupo control se produce un descenso de  $0,68 \pm 0,08$  mg/dL a  $0,65 \pm 0,09$  mg/dL.



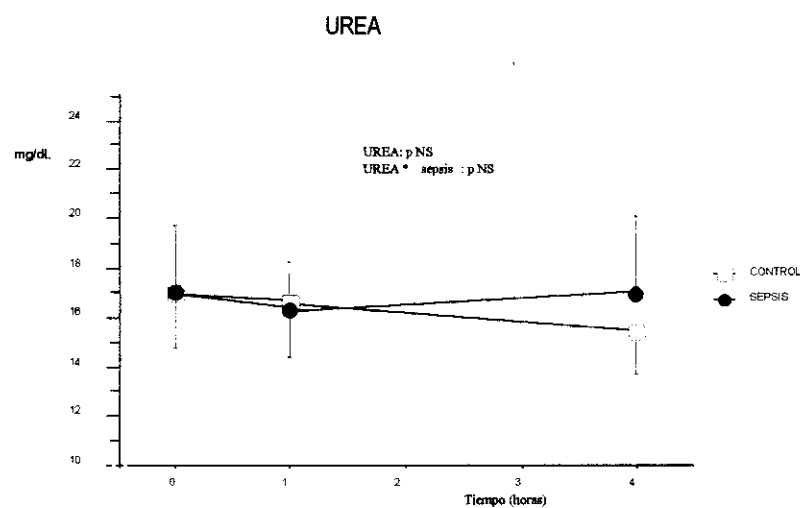
## g) URATO

Los niveles de concentración sérica de urato sufren una variación significativa a lo largo del tiempo de transcurso del experimento (Tiempo:  $p<0,0001$ ). En el grupo séptico el urato aumenta significativamente con respecto al grupo control (Tiempo \* sepsis:  $p<0,0001$ ). Esta diferencia entre el grupo control frente al séptico es significativa en la cuarta hora de evolución ( $p=0,002$ ).



**f) UREA**

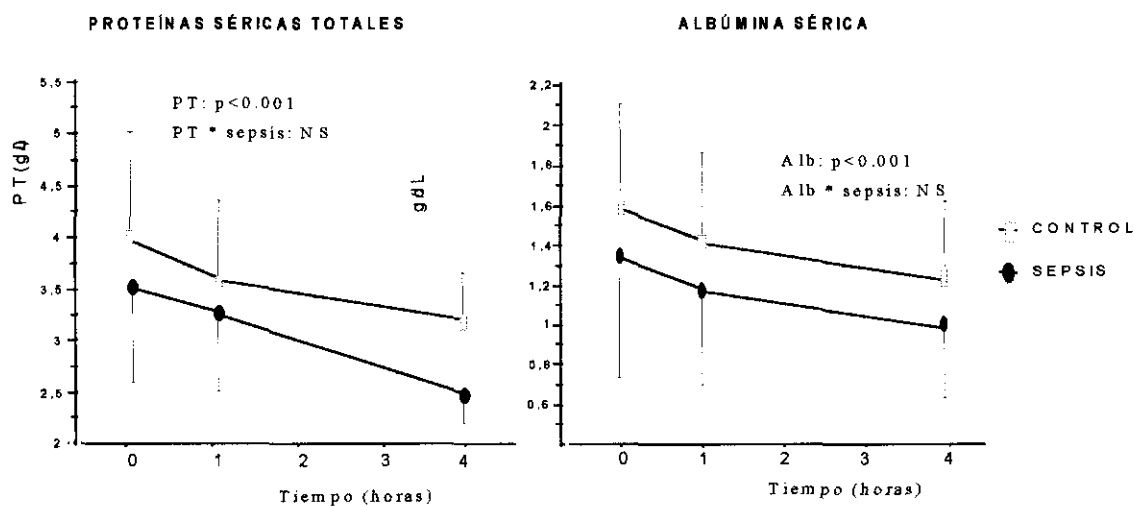
La urea no varía significativamente al lo largo de la evolución del experimento (p NS). No se observan diferencias significativas en la evolución de la urea en función de la presencia o no de sepsis (p = 0,08). La urea basal en el grupo control fue de  $17 \pm 2,1$  mg/dL evolucionando a  $15,5 \pm 1,7$  mg/dL al final de la evolución. En el grupo séptico el cambio que se produce es de  $17,0 \pm 2,7$  a  $16,9 \pm 1,9$  mg/dL.



**g) PROTEÍNAS TOTALES (PT)**

Durante la evolución del experimento la concentración de proteínas totales séricas

sufren un descenso significativo ( $p < 0,0001$ ). Como puede observarse en la figura, la variación en ambos grupos ocurre de un modo similar; en efecto, la interacción evolución \* sepsis no es significativa ( $p = 0,51$ ). Las concentraciones halladas en el grupo control al inicio del experimento fueron de  $3,99 \pm 1,05$  mg/dL que descendieron a  $3,16 \pm 0,50$  mg/dL. En el grupo séptico los valores hallados en el momento basal fueron de  $3,18 \pm 0,5$  mg/dL que variaron a  $2,48 \pm 0,24$  mg/dL en la hora cuatro de evolución.



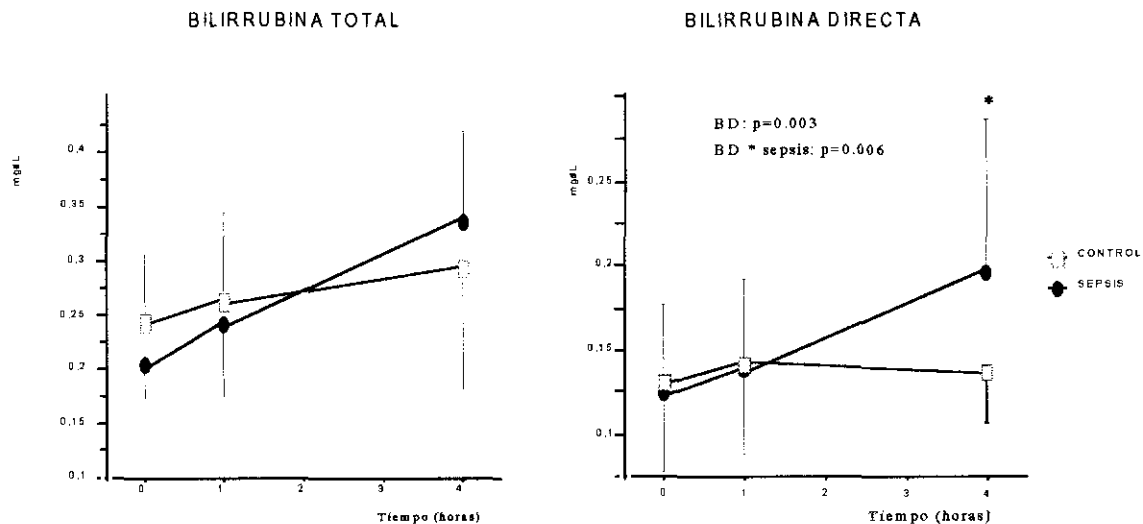
## h) ALBÚMINA

De una forma similar a lo que sucede en la variación que sufren las proteínas totales a lo largo de la evolución, la concentración de albúmina sérica disminuye significativamente durante el tiempo de desarrollo del experimento ( $p < 0,0001$ ). Esta variación ocurre de forma análoga en ambos grupos (Tiempo \* sepsis:  $p = NS$ ). La albúmina basal en el grupo control fue de  $1,59 \pm 0,5$  mg/dL que cambia a  $1,24 \pm 0,4$  mg/dL al final del experimento. En el grupo séptico el cambio que se produce es de  $1,34 \pm 0,6$  mg/dL al comienzo del experimento a  $1,0 \pm 0,4$  mg/dL después de cuatro horas de evolución séptica.

## i) BILIRRUBINA TOTAL (BT)

La bilirrubina total sufre alteraciones en el transcurso del experimento (Tiempo:  $p <$

0,0001). La evolución que se observa no se diferencia estadísticamente significativa en función de la presencia de sepsis o no (Tiempo \* sepsis:  $p = NS$ ). Las concentraciones halladas en el grupo control al inicio del experimento fueron de  $0,2 \pm 0,06$  mg/dL que se incrementaron a  $0,293 \pm 0,1$  mg/dL. En el grupo séptico los valores hallados en el momento basal fueron de  $0,2 \pm 0,03$  mg/dL que variaron a  $0,33 \pm 0,08$  mg/dL en la hora cuatro de evolución.



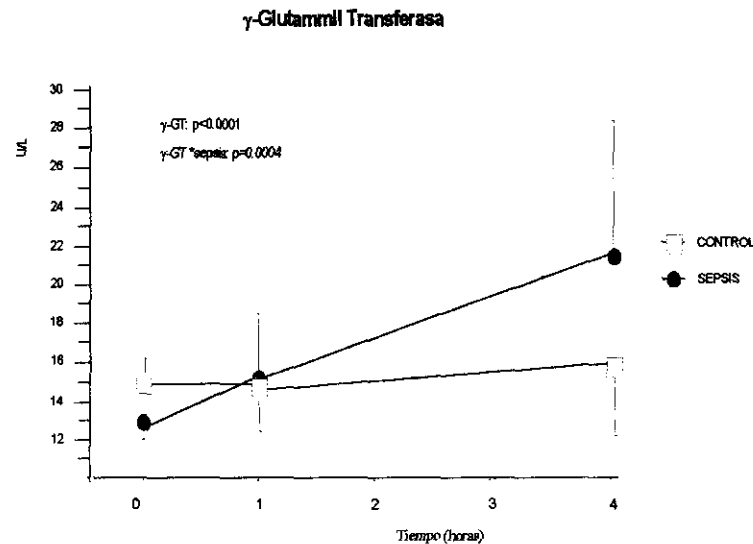
#### j) BILIRRUBINA DIRECTA (BD)

La bilirrubina sufre variación significativa a lo largo del transcurso del experimento (Tiempo:  $p = 0,003$ ). En el grupo séptico el incremento que se produce es significativamente diferente al del grupo control (Tiempo \* sepsis:  $p = 0,006$ ). La concentración media de bilirrubina directa en el grupo control en el momento basal es de  $0,13 \pm 0,04$  mg/dL que como puede apreciarse en la figura apenas sufre variación siendo la concentración en el momento final de  $0,14 \pm 0,03$  mg/dL. Sin embargo, en el grupo séptico la variación es de  $0,12 \pm 0,05$  mg/dL a  $0,19 \pm 0,09$  mg/dL.

#### L) $\gamma$ - GLUTAMILTRANSFERASA ( $\gamma$ -GT)

La  $\gamma$ -GT experimenta variación significativa a lo largo del experimento ( $p =$

0,0004). La  $\gamma$ -GT experimenta variación significativa en la sepsis ( $p = 0,0004$ ). A lo largo del proceso séptico se produce una variación de  $12,9 \pm 1,16$  U/L hasta una actividad final de  $21,4 \pm 7,2$  U/L.

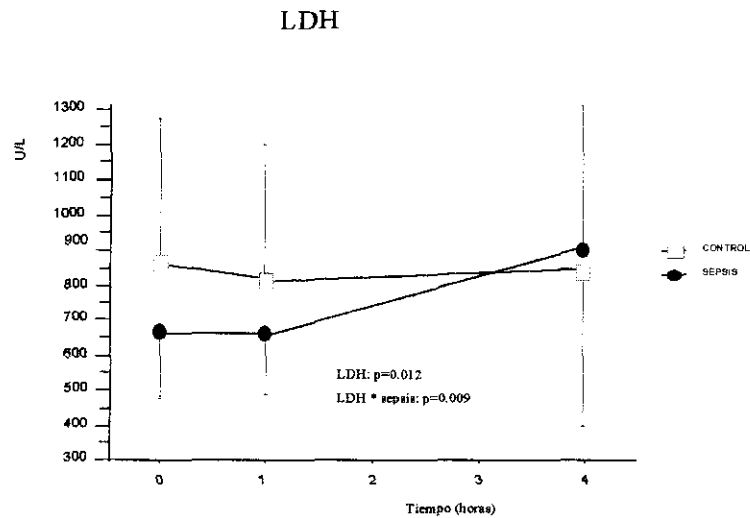


**Fig R20: Cambios en la actividad de  $\gamma$ -GT durante la sepsis:** En el grupo séptico ( $\bullet$ ), se observa un incremento significativo.

### M) LACTATODESHIDROGENASA (LDH)

La actividad de la LDH sufre un incremento significativo durante la sepsis (Tiempo \* sepsis:  $p = 0,009$ ), pasando de unos valores de  $668 \pm 183,5$  U/L al comienzo del experimento, hasta un valor de  $903 \pm 412$  U/L a las cuatro horas. Como puede observarse en la figura R23, a pesar de que la variabilidad interindividual es importante, los cambios que se producen son significativos.

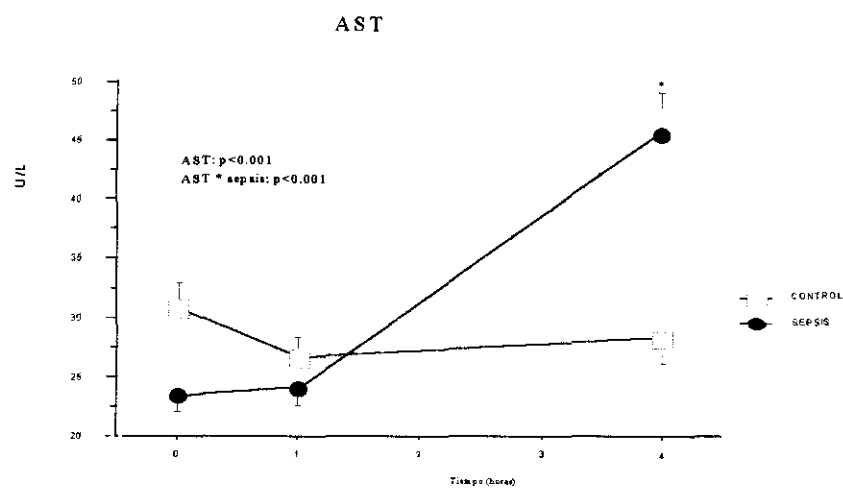




**Fig R21: Cambios en la actividad de LDH durante la sepsis:** En el grupo séptico (●) se observa un incremento significativo.

### N) ASPARTATOAMINOTRANSFERASA (AST)

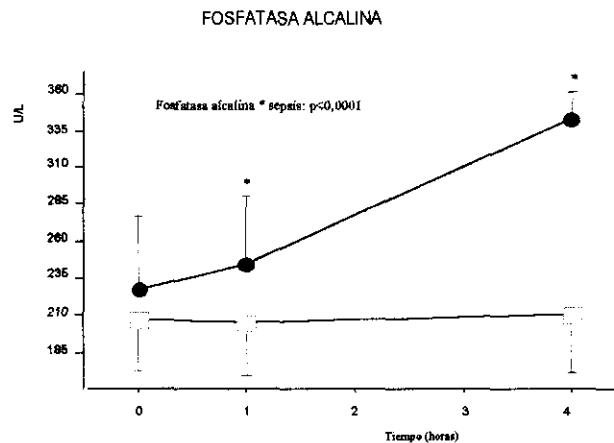
El enzima AST incrementa de forma importante su actividad durante la sepsis (AST \* sepsis:  $p = 0,0001$ ). Como puede observarse en la figura la actividad de la AST se incrementa de un valor medio de  $23,4 \pm 4,7$  U/L al inicio del experimento hasta un valor de  $45,5 \pm 12,19$  U/L al final de éste.



**Fig R22: Cambios en la actividad de AST durante la sepsis:** Se observan cambios significativos en el comportamiento del grupo séptico (●).

### Ñ) FOSFATASA ALCALINA

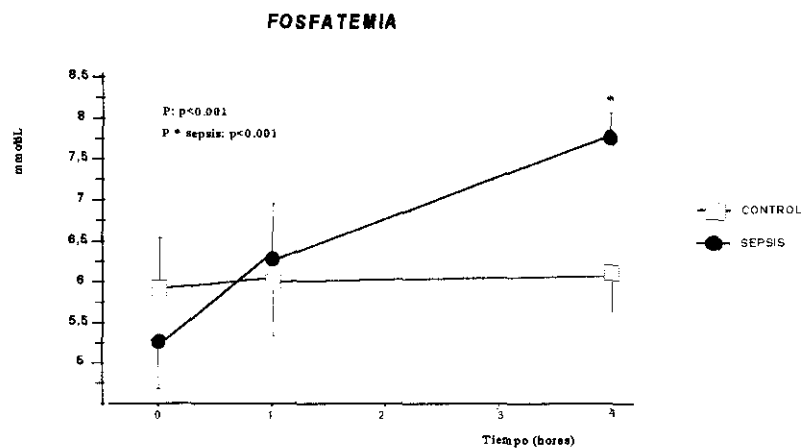
La sepsis induce un incremento significativo en la actividad de la fosfatasa alcalina sérica (Fosfatasa alcalina \* sepsis:  $p=0,0001$ ). Esta tendencia al incremento comienza a manifestarse desde las fases iniciales de la sepsis.



**Fig R23: Cambios en la actividad de fosfatasa alcalina durante la sepsis:** Se observan cambios significativos en el comportamiento del grupo séptico (\*).

### O) FOSFATEMIA

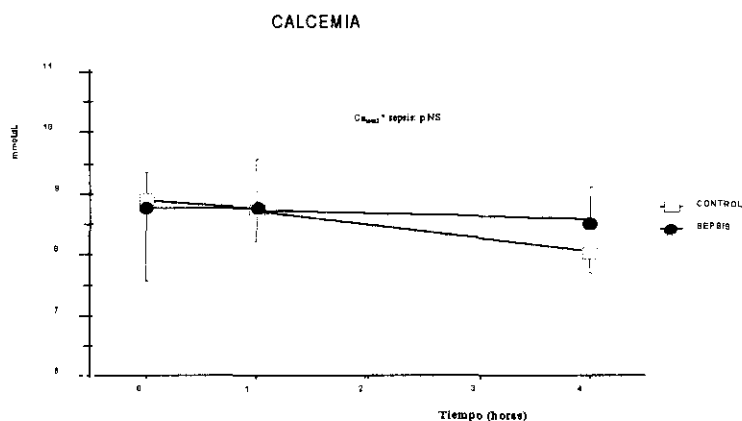
En el proceso séptico se observa un importante incremento de la concentración sérica de fosfato (Tiempo \* sepsis:  $p < 0,0001$ ). Como se observa en la figura la fosfatemia varía en el grupo séptico desde un valor inicial de  $5,2 \pm 0,5$  mmol/dL hasta un valor final de  $7,7 \pm 0,3$  mmol/dL. Mientras que en el grupo control no se observan variaciones.



**Fig R24: Cambios en la fosfatemia durante la sepsis:** En el grupo séptico (\*), se observa un incremento a lo largo de la evolución, que se hace significativo (\*) en la hora cuatro.

## P) CALCEMIA

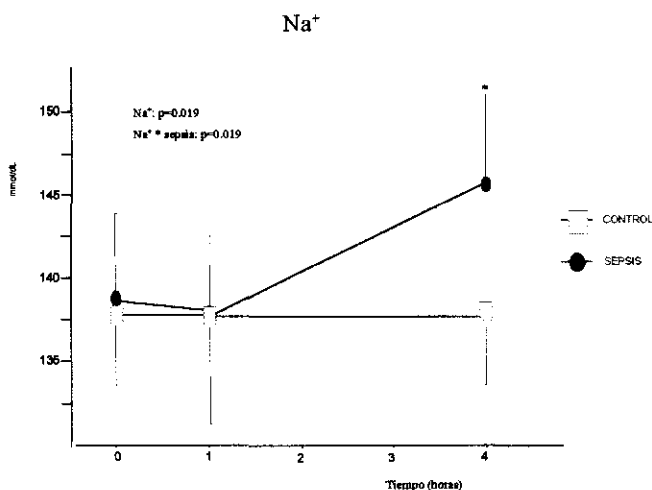
A lo largo de la evolución del experimento no se observan cambios significativos en la calcemia no existiendo diferencias significativas en el comportamiento del grupo control y del grupo séptico.



**Fig R25: Cambios en la calcemia durante la sepsis:** No se observan cambios significativos en el comportamiento del grupo séptico (\*).

## Q) IÓN SODIO

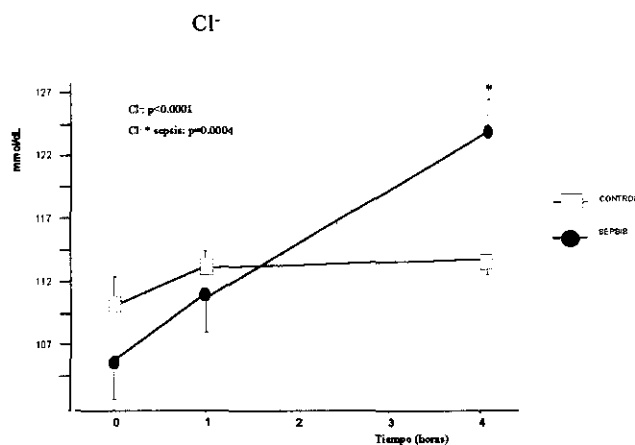
La sepsis produce un incremento significativo de la concentración sérica del ión  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}^+ * \text{sepsis}: p = 0,019$ ). Como puede observarse en la figura, en el grupo control la concentración de  $\text{Na}^+$  se mantiene constante durante las cuatro horas de evolución, mientras que en el grupo séptico se observa un incremento significativo en la cuarta hora.



**Fig R26: Cambios en el ión sodio durante la sepsis:** se observa un incremento significativo (\*) en el grupo séptico (\*).

## R) IÓN CLORURO

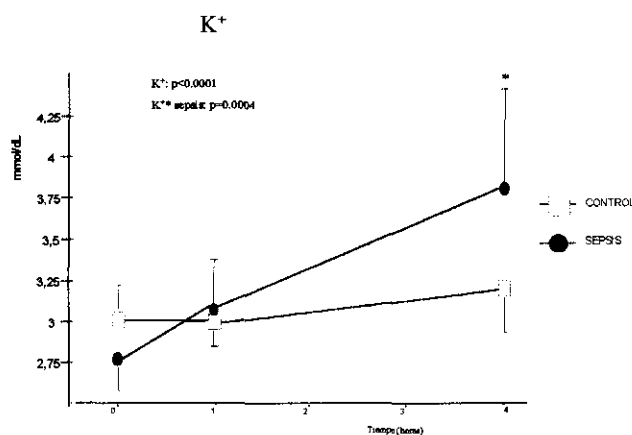
De forma análoga a lo observado en la variación de la concentración sérica del ión  $\text{Na}^+$ , la concentración de ión cloruro experimenta un incremento significativo en la sepsis ( $\text{Cl}^-$  \* sepsis:  $p=0,0004$ ). Este incremento difiere estadísticamente respecto al grupo control en la hora cuatro de la evolución de la sepsis.



**Fig R27: Cambios en la concentración sérica de ión cloruro durante la sepsis:** se observa un incremento significativo (\*) en el grupo séptico (●).

## S) IÓN POTASIO

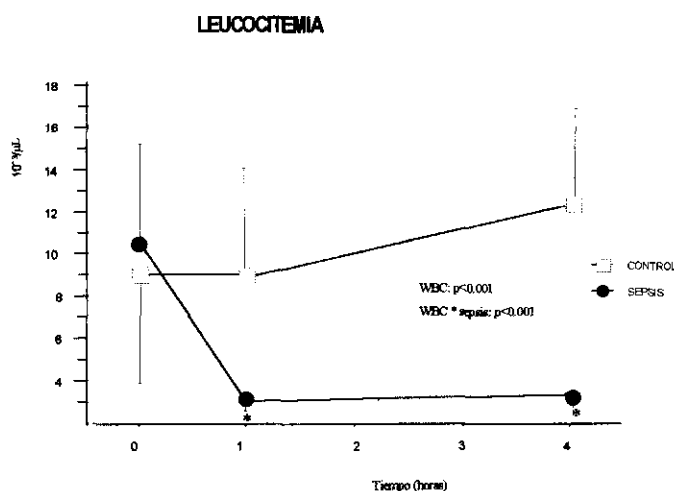
La sepsis incrementa de forma significativa la concentración de ión potasio ( $\text{K}^+$  \* sepsis:  $p=0,0004$ ). Se produce un aumento de una concentración media basal de  $2,78 \pm 0,25$  mmol/L hasta una concentración final de  $3,7 \pm 0,7$  mmol/L en la cuarta hora.



**Fig R28: Cambios en la concentración sérica de potasio durante la sepsis:** se observa un incremento significativo (\*) en el grupo séptico (●).

## T) LEUCOCITEMIA (WBC)

En nuestro modelo séptico se produce un importante descenso del número de leucocitos/mL en la circulación sistémica (WBC \* sepsis:  $p < 0,0001$ ). Como puede observarse en la figura, la leucopenia tiene lugar ya en la fase más precoz de la sepsis, a partir de la primera hora posterior a la inducción séptica.

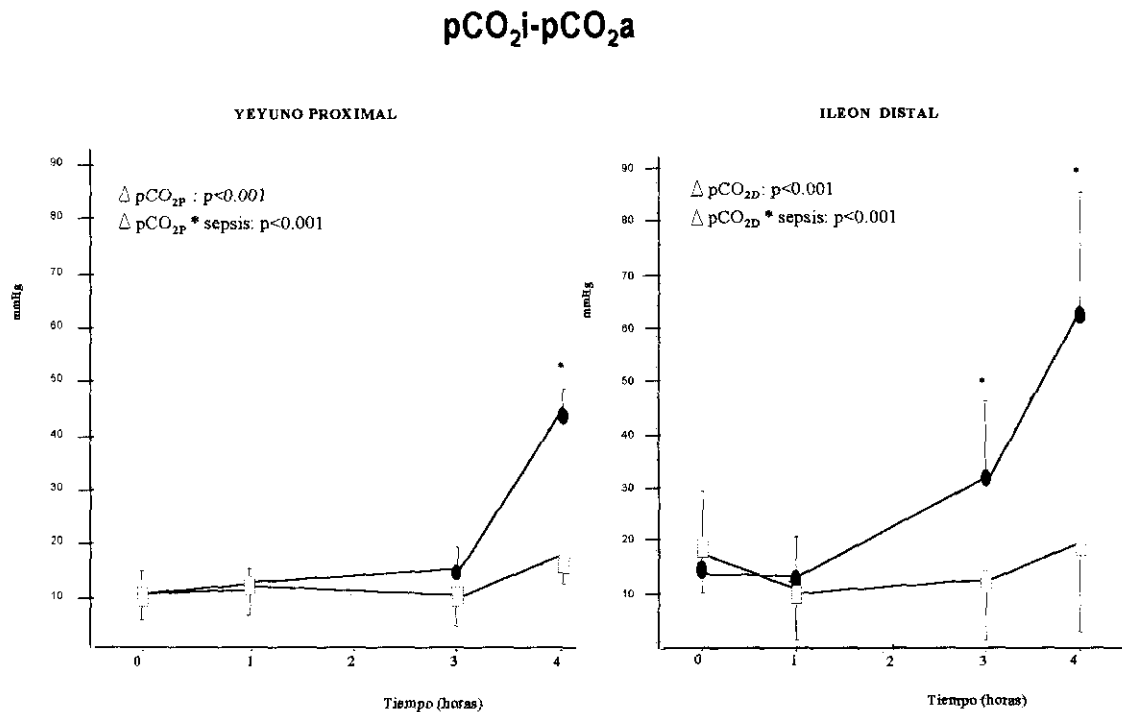


**Fig R29: Cambios en número de leucocitos circulantes (WBC) durante la sepsis:** se observa un incremento significativo (\*) en el grupo séptico (\*).

## U) INDICADOR BIOQUÍMICO DE HIPOPERFUSIÓN REGIONAL: $p\text{CO}_2\text{i} - p\text{CO}_2\text{a}$ ( $\Delta p\text{CO}_2$ ).

Se ha medido la  $p\text{CO}_2$  intraluminal en dos segmentos intestinales diferentes: el yeyuno proximal y el íleon distal. En ambos segmentos se observa que la sepsis produce un aumento significativo del incremento  $p\text{CO}_2$  intraluminal -  $p\text{CO}_2$  arterial ( $\Delta p\text{CO}_2$  \* sepsis:  $p < 0,001$  en ambos segmentos). En el tramo proximal se produce una variación de  $10,03 \pm 3,7$  mmHg al inicio del experimento hasta un valor de  $43,7 \pm 7,4$  mmHg en la hora cuatro. Sin embargo, como puede observarse en la figura R30, el comportamiento de ambos segmentos es diferente. Al comienzo del experimento, el íleon distal parte de unos valores medios de  $\Delta p\text{CO}_2$  superiores a los del yeyuno proximal (la diferencia es estadísticamente significativa:  $p = 0,004$ ). También es diferente la evolución del segmento proximal a la del yeyuno distal ya que en el fragmento distal el  $\Delta p\text{CO}_2$  a comienza a incrementarse a partir de la hora tres (siendo estadísticamente significativa la diferencia con respecto al grupo control). Por el contrario en el tramo proximal esta diferencia es significativa a partir de la

cuarta hora. Por lo tanto, el  $\Delta pCO_2$  se manifiesta de manera más precoz en el íleon distal que en el duodeno proximal. Además, el incremento que tiene lugar en el íleon distal es cuantitativamente más importante (diferencia significativa:  $p = 0,05$ ), que el que se produce en el fragmento proximal.



**Figura R30.- Variación del incremento  $pCO_{2i}$  intraluminal -  $pCO_{2a}$  arterial ( $\Delta pCO_2$ ):**

Valores de incremento de  $pCO_2$  a lo largo de la evolución séptica, en estado basal (tiempo=0) y después de 1, 3 y 4 horas posteriores a la inducción de la sepsis en ambos tramos intestinales.

- \*: diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control.
- : grupo séptico
- : grupo control

## V) PARÁMETROS ESTIMADORES DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO:

### 1.- RSNOs

Las concentraciones basales medias de RSNOs halladas en los cerdos estudiados han sido de  $1,15 \pm 0,7 \mu M$  en el grupo control y  $1,33 \pm 0,57 \mu M$  en el grupo séptico. La evolución que sufre este parámetro a lo largo del experimento difiere significativamente en presencia de sepsis (RSNOs \* sepsis:  $p < 0,0001$ ). La sepsis produce un importante incremento de la concentración sérica de nitrosotioles llegando a alcanzar a las cuatro horas de evolución una concentración media de  $4,47 \pm 0,7 \mu M$ , es decir más de tres veces la concentración inicial. Como se observa en la figura este incremento no se produce en la

fase inicial de la sepsis.

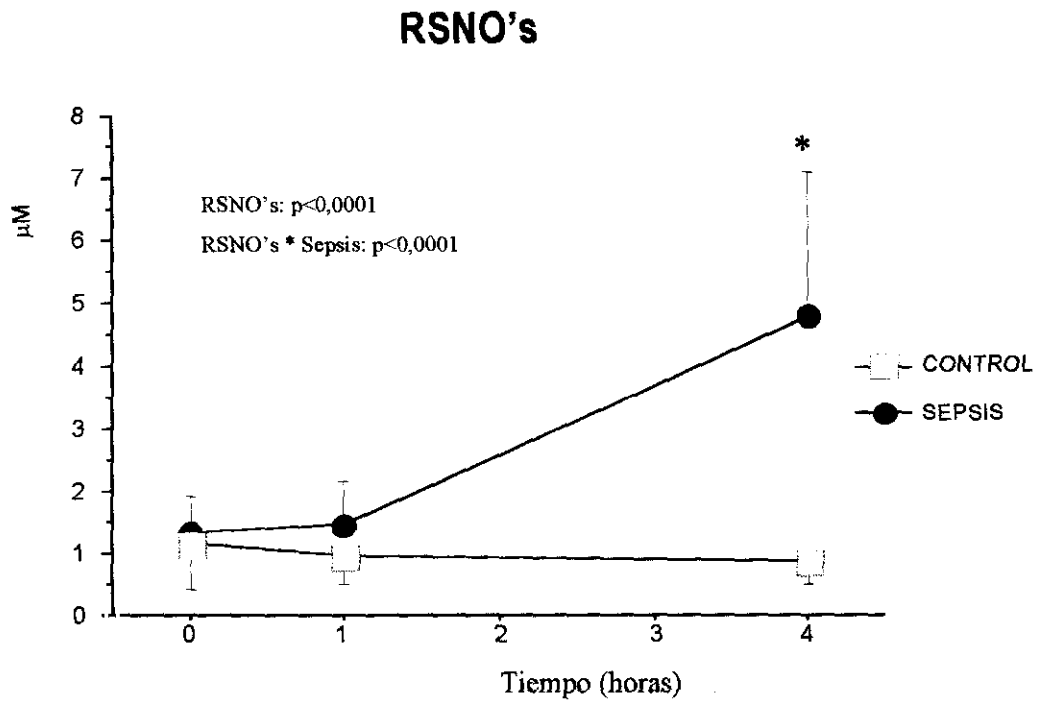


Fig. 31: Variación de RSNOs durante la sepsis.

## 2.- NITRATOS Y NITRITOS.

En este modelo de sepsis no se produce un incremento significativo de la concentración de nitratos y nitritos, si bien se observa cierta tendencia al incremento en la cuarta hora.

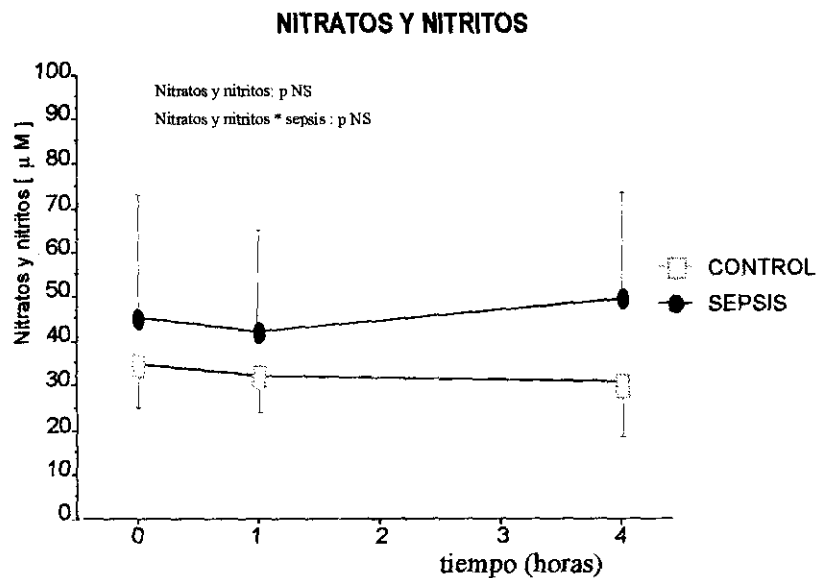


Fig. 32: Variación de nitratos y nitritos durante la sepsis.

Los cambios bioquímicos y hematológicos que se producen en la sepsis se resumen en el siguiente cuadro:

### CAMBIOS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS

Las alteraciones bioquímicas y hematológicas pueden sintetizarse en lo siguiente:

- Indicadores de carácter metabólico: ↓ pH arterial, ↑ lactato, ↑ TG, ↑ urato, sin cambios en la glucemia.
- Indicadores de función renal: ↑ urato, sin cambios en la creatinina y en urea.
- Marcadores hepáticos: ↑ BT, ↑ BD, ↑  $\gamma$ -GGT, ↑ LDH, ↑ AST.
- Leucopenia severa.
- Otros: ↑ ión fosfato, ↑ Na<sup>+</sup>, ↑ Cl<sup>-</sup>, ↑ K<sup>+</sup>, ↑ fosfatasa alcalina.

*Indicadores de alteraciones de tipo regional:*

- ↑  $\Delta pCO_2$  en yeyuno proximal y íleon distal, siendo más pronunciado y precoz en el íleon distal.

*Indicadores de la producción de NO:*

- ↑ RSNOs a las cuatro horas de la inducción séptica.

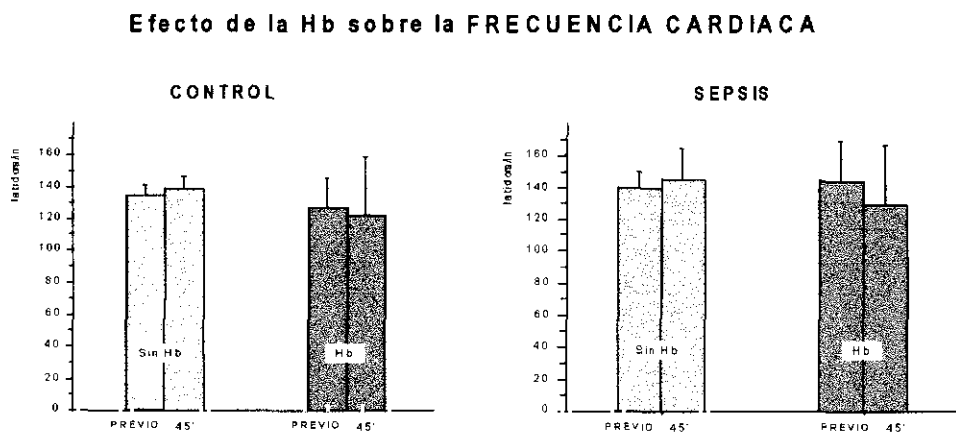


## 2. EFECTOS HEMODINÁMICOS DE LA HEMOGLOBINA

Para conocer las acciones de la Hb se ha estudiado el efecto que ésta produce mediante la comparación de los parámetros hemodinámicos entre aquellos animales que recibían la infusión de Hb y aquellos que no la recibían tanto en el caso de animales control como en los sépticos. Las medidas hemodinámicas se realizan en la cuarta hora de evolución (justo antes del comienzo de la infusión, representado en las figuras como “previo”) y 45 minutos después (45'). De esta forma podemos asegurar que los efectos observados no se deben a la evolución de la sepsis en ese tiempo. En un apartado posterior, “relación dosis-respuesta de la Hb”, se estudiará la diferencia entre el efecto de la Hb en el grupo control y séptico para las diferentes dosis administradas.

### A) Acción de la Hb sobre la FRECUENCIA CARDIACA

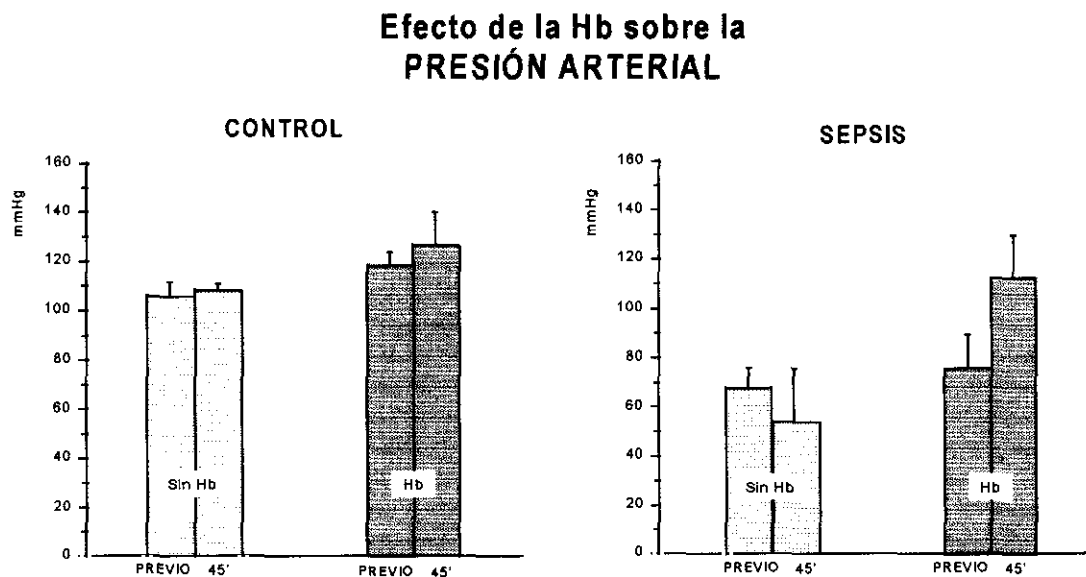
La Hb no produce cambios en la FC (Tiempo \* Hb: p NS) y este efecto no difiere en función de la presencia de sepsis o no (Tiempo \* sepsis \* Hb: p NS) (Consultar Anexo). El grupo control que no recibe Hb presenta una frecuencia cardíaca previa de  $134,6 \pm 7,2$  latidos/min que a los 45' es de  $138,8 \pm 7,6$  latidos/min; el que recibe Hb partía de una FC media de  $127,8 \pm 18,2$  latidos/min que después de la Hb es de  $122,6 \pm 36,6$  latidos/min. Aunque el efecto global de la Hb no es significativo, en la gráfica podemos observar que la Hb produce, tanto en el grupo control como en el séptico, cierto descenso de la FC.



**Fig R33: Acción de la Hb sobre la FC:** la Hb (gris oscuro) no produce cambios significativos en la FC frente al grupo no tratado (gris claro). Los efectos comparados han sido la FC antes de la administración de Hb (previo) frente a la existente después de 45'.

## B) Acción de la Hb sobre la PRESIÓN ARTERIAL MEDIA

La Hb produce un intenso efecto hipertensor (tiempo \* Hb:  $p < 0,0001$ ). En el grupo control la PAM se incrementa de  $118 \pm 5,8$  mmHg a  $126,8 \pm 13,2$  mmHg, es decir, un incremento del 7,4%. En el grupo séptico este aumento es superior ya que se pasa de una PAM de  $75,8 \pm 13,99$  mmHg a una PAM de  $113,3 \pm 17,6$ , un incremento del 49,45%. De hecho el efecto de la Hb es significativamente diferente dependiendo de la existencia de sepsis (Tiempo \* Hb \* sepsis:  $p < 0,0001$ ). [La diferencia de los efectos de la Hb en los diferentes grupos (control y el séptico) se detallarán posteriormente en el apartado siguiente]. Por el contrario, los grupos que no reciben Hb no sufren apenas variación ya que el grupo control pasa de una PAM de  $105,8 \pm 5,4$  mmHg a  $108,3 \pm 2,3$  mmHg y en el grupo séptico desciende la PAM como consecuencia de la evolución séptica de  $67,3 \pm 8,3$  mmHg a  $54,3 \pm 21,9$  mmHg.



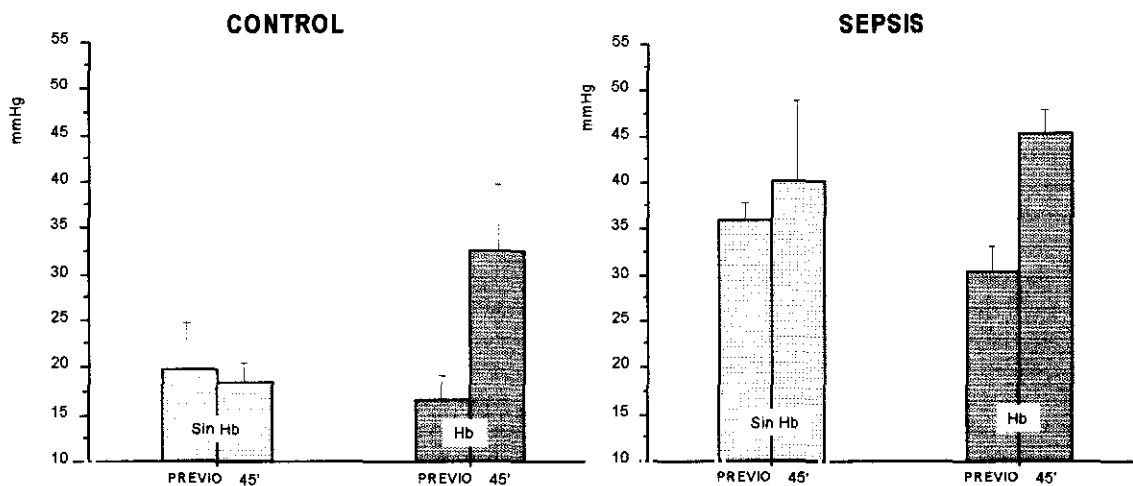
**Fig R34: Acción de la Hb sobre la PAM:** la Hb (gris oscuro) produce un incremento significativo en la PAM, tanto en el grupo séptico como no séptico (control), frente al grupo no tratado (gris claro). Los efectos comparados han sido la PAM antes de la administración de Hb (previo) frente a la existente después de 45'.

## C) Efecto de la Hb sobre la PRESIÓN de la ARTERIA PULMONAR

La Hb provoca un aumento significativo de la PAP (Tiempo \* Hb:  $p < 0,0001$ ). Este efecto se manifiesta tanto en el grupo control como en el séptico, no existiendo diferencias en este incremento en función de que haya sepsis o no (tiempo \* Hb \* sepsis:  $p$  NS). En el

grupo control el incremento es de  $16,6 \pm 2,4$  mmHg a  $32,5 \pm 7,2$  mmHg, prácticamente se duplica y en el grupo séptico pasa de  $30,3 \pm 2,9$  mmHg a  $45,3 \pm 2,6$  mmHg (un incremento del 49,45%). Por el contrario la variación que existe en los grupos que no reciben Hb es de  $19,8 \pm 4,8$  mmHg a  $18,3 \pm 2,25$  mmHg en el grupo control y de  $36 \pm 1,7$  a  $40,3 \pm 8,6$  mmHg en el grupo séptico.

### Efecto de la Hb sobre la PRESIÓN de la ARTERIA PULMONAR

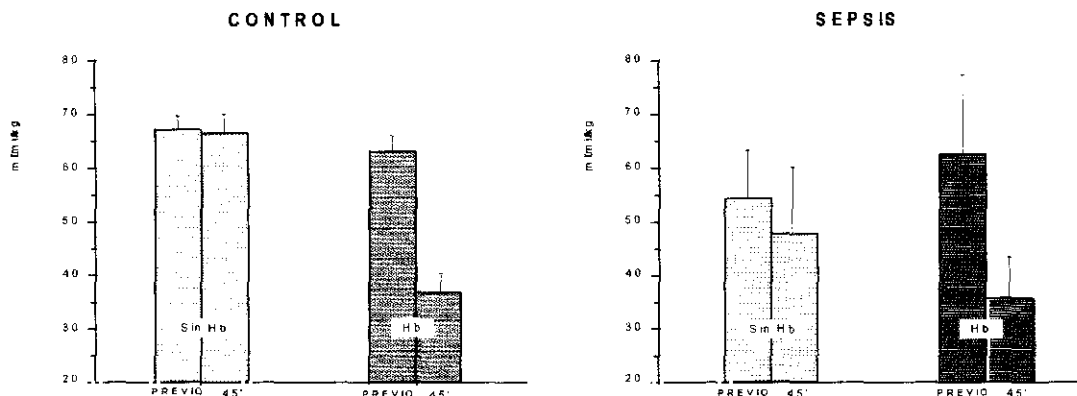


**Fig R35: Acción de la Hb sobre la PAP:** la Hb (gris oscuro) produce un incremento significativo en la PAP, tanto en el grupo séptico como no séptico (control), frente al grupo no tratado (gris claro). Los efectos comparados han sido la PAP antes de la administración de Hb (previo) frente a la existente después de 45'.

#### D) Acción de la Hb sobre el INDICE CARDIACO

La Hb produce un importante descenso del IC (Tiempo \* Hb:  $p=0,0004$ ). Este hecho se produce tanto en el grupo control como en el grupo séptico, sin que exista diferencia significativa en la evolución que experimentan ambos grupos con la Hb (Tiempo \* Hb \* sepsis). En el grupo control el IC desciende de  $63,1 \pm 8,1$  mL/min/kg a  $36,8 \pm 9,07$  mL/min/kg (41,6%) y en el grupo séptico de  $62,4 \pm 36,7$  mL/min/kg a  $35,7 \pm 19,6$  mL/min/kg (42,7%). Por el contrario, en el grupo control que no recibe Hb el IC no sufre apenas variación, de  $67,1 \pm 7,2$  a  $66,9 \pm 8,6$  mL/min/kg y en el grupo séptico la variación es de  $54,3 \pm 23,5$  mL/min/kg a  $47 \pm 31,2$  mL/min/kg, cambio muy inferior a la que se produce en los animales que reciben Hb.

**Efecto de la Hb sobre el INDICE CARDIACO**

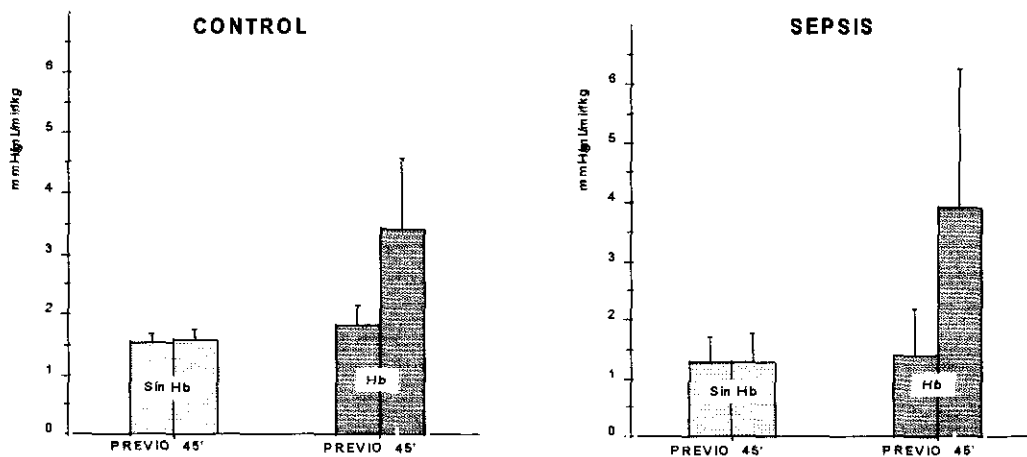


**Fig R36: Acción de la Hb sobre el IC:** la Hb (gris oscuro) produce un descenso significativo del IC, tanto en el grupo séptico como no séptico (control), frente al grupo no tratado (gris claro). Los efectos comparados han sido el IC antes de la administración de Hb (previo) frente al existente después de 45'.

**E) Efecto de la Hb sobre la RESISTENCIA VASCULAR SISTÉMICA**

La Hb provoca un aumento significativo de la RVS (Tiempo \* Hb:  $p < 0,0001$ ). El incremento del grupo control es de  $1,8 \pm 0,3$  a  $3,44 \pm 1,1$  (91,1 %) y en el grupo séptico de  $1,4 \pm 0,7$  a  $3,9 \pm 2,3$  (178 %). Este incremento en la RVS no difiere entre el grupo control y el séptico (Tiempo \* Hb \* sepsis: p NS). Como puede verse en la figura, en los grupos que no han recibido Hb no se produce incremento.

**Efecto de la Hb sobre la RESISTENCIA VASCULAR SISTÉMICA**

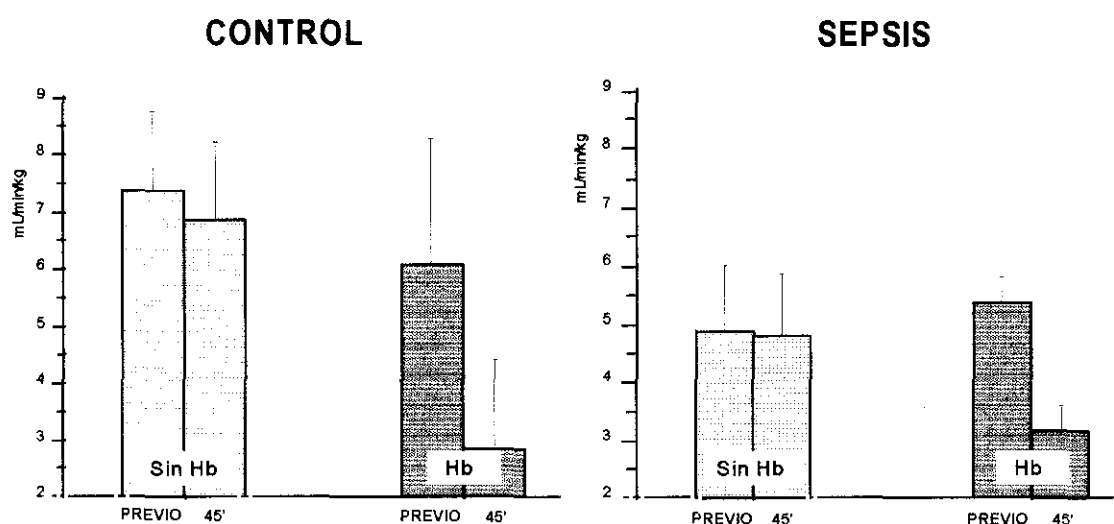


**Fig R37: Acción de la Hb sobre la RVM:** la Hb (gris oscuro) produce un incremento significativo en la RVM, tanto en el grupo séptico como no séptico (control), frente al grupo no tratado (gris claro). Los efectos comparados han sido la RVM antes de la administración de Hb (previo) frente a la existente después de 45'.

## F) Acción sobre el FLUJO MESENTÉRICO

La Hb provoca un marcado descenso del Qmes (Tiempo \* Hb:  $p < 0,0001$ ) tanto en el grupo control como en el grupo séptico. Como puede verse en la figura este efecto se manifiesta de forma análoga en ambos grupos, de hecho, no es significativo la presencia de sepsis o no en el descenso de flujo que produce la Hb (Tiempo \* sepsis \* Hb:  $p$  NS).

### Efecto de la Hb sobre el FLUJO MESENTÉRICO

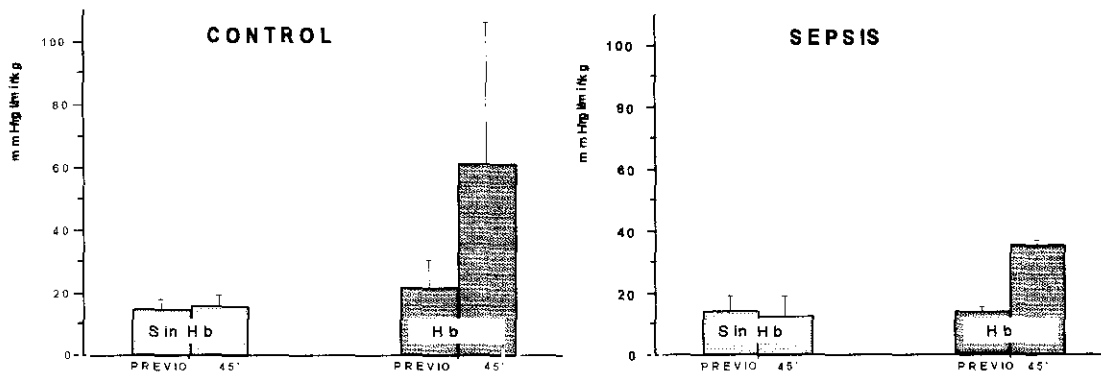


**Fig R38: Acción de la Hb sobre el Qmes:** la Hb (gris oscuro) produce un descenso significativo del Qmes, tanto en el grupo séptico como no séptico (control), frente al grupo no tratado (gris claro). Los efectos comparados han sido el Qmes antes de la administración de Hb (previo) frente al existente después de 45'.

## G) Efecto sobre la RESISTENCIA VASCULAR MESENTÉRICA.

La Hb produce un incremento significativo en la resistencia vascular mesentérica (Tiempo \* Hb:  $p = 0,004$ ). En el grupo control se observa un incremento de una RVM de  $22 \pm 9,6$  mmHg/mL/min\*kg a  $61,3 \pm 64,1$  mmHg/mL/min\*kg. En el grupo séptico el incremento es de  $14 \pm 2,12$  mmHg/mL/min\*kg a  $35,3 \pm 2,4$  mmHg/mL/min\*kg.

**Efecto de la Hb sobre la RESISTENCIA VASCULAR MESENTÉRICA**

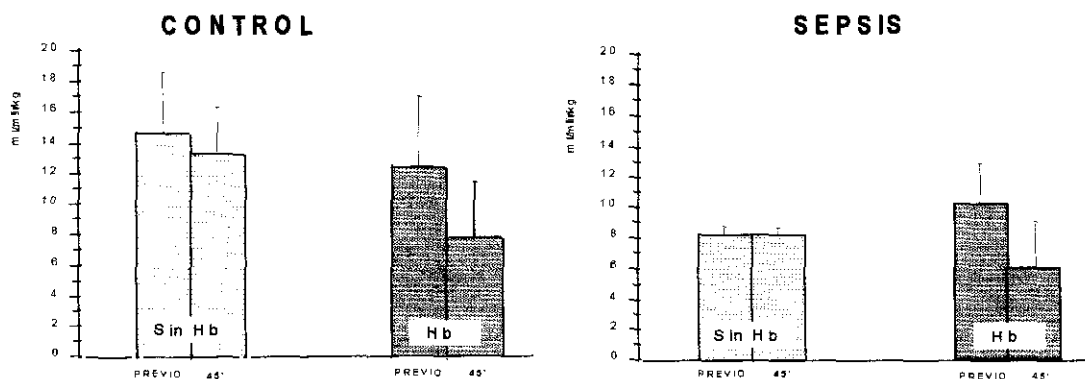


**Fig R39: Acción de la Hb sobre la RVM:** la Hb (gris oscuro) produce un descenso significativo de la RVM, tanto en el grupo séptico como no séptico (control), frente al grupo no tratado (gris claro). Los efectos comparados han sido la RVM antes de la administración de Hb (previo) frente al existente después de 45'.

**H) Efecto de la hemoglobina sobre el FLUJO PORTAL**

De una forma similar a lo que ocurre con el Qmes, la Hb produce un marcado descenso del Qp (Tiempo \* Hb:  $p < 0,0001$ ). No existe diferencia significativa entre el efecto que provoca la Hb sobre el grupo control y el grupo séptico (Tiempo \* Hb \* sepsis:  $p$  NS). En el grupo control que recibe Hb el flujo portal medio disminuye de  $12,39 \pm 4,6$  mL/min/kg a  $7,8 \pm 3,7$  mL/min/kg y en el grupo séptico de  $10,3 \pm 2,8$  mL/min/kg a  $6,1 \pm 3,1$  mL/min/kg (40,7%).

**Efecto de la Hb sobre el FLUJO PORTAL**



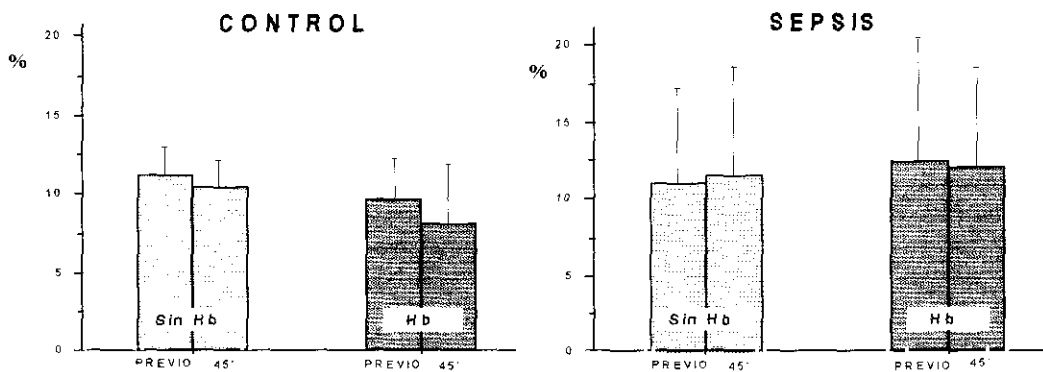
**Fig R40: Acción de la Hb sobre el Qp:** la Hb (gris oscuro) produce un descenso significativo del Qp, tanto en el grupo séptico como no séptico (control), frente al grupo no tratado (gris claro). Los efectos comparados han sido el Qmes antes de la administración de Hb (previo) frente al existente después de 45'.

**l) Efecto de la Hb sobre la REDISTRIBUCIÓN DE FLUJO**

**a) Efecto sobre la ratio:  $Q_{mes}/IC$ .**

La Hb no produce ningún cambio en el porcentaje de  $Q_{mes}$  con respecto al total (Tiempo \* Hb: p NS). Este hecho sucede tanto en el grupo séptico como en el grupo control (Tiempo \* Hb \* sepsis: p NS).

**Efecto de la Hb sobre el INDICE de FLUJO MESENTÉRICO**

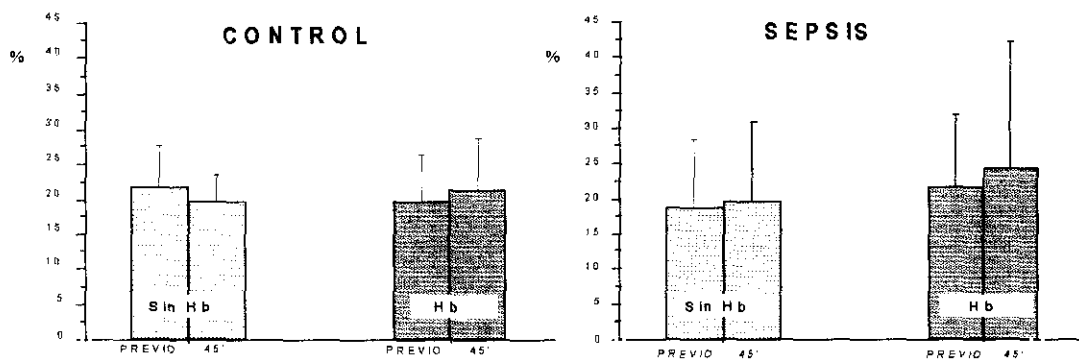


**Fig R41: Acción de la Hb sobre la ratio  $Q_{mes}/IC$ :** la Hb (gris oscuro) no produce cambios significativos en este parámetro, tanto en el grupo séptico como no séptico (control), frente al grupo no tratado (gris claro). Los efectos comparados han sido el  $Q_{mes}/IC$  antes de la administración de Hb (previo) frente al existente después de 45'.

**b) Efecto sobre la ratio:  $Q_p/IC$ .**

La Hb no produce ningún cambio en el porcentaje de  $Q_p$  con respecto al total (Tiempo \* Hb: p NS). Este hecho sucede tanto en el grupo séptico como en el grupo control (Tiempo \* Hb \* sepsis: p NS).

**Efecto de la Hb sobre el INDICE de FLUJO PORTAL**



**Fig R42: Acción de la Hb sobre la ratio  $Q_p/IC$ :** la Hb (gris oscuro) no produce cambios significativos en este parámetro, tanto en el grupo séptico como no séptico (control), frente al grupo no tratado (gris claro). Los efectos comparados han sido el  $Q_p/IC$  antes de la administración de Hb (previo) frente al existente después de 45'.

Los efectos hemodinámicos observados en los animales a los que se les administra Hb frente a los animales no tratados, pueden resumirse en la siguiente tabla:

**EFFECTOS HEMODINÁMICOS de la Hb:****• ACCIONES SISTÉMICAS:**

- No altera: FC, IC.
- ↑ PAM.
- ↑ PAP.
- ↑ RVS.

**• EFECTOS REGIONALES:**

- ↓ Qmes con ↑ RVM.
- ↓ Qp.
- No produce cambios en: Qmes/IC y Qp/IC.



### 3. EFECTO DOSIS-RESPUESTA de la HEMOGLOBINA

En el apartado anterior se han expuesto los efectos netos que produce la administración de Hb, frente a la evolución que sufren los animales en ese mismo periodo de tiempo cuando éstos no son tratados. En esta nueva sección se van a exponer las acciones hemodinámicas de la Hb desglosadas para cada una de las dosis administradas comparando el comportamiento en el grupo séptico frente al control.

#### A) EFECTO sobre la FRECUENCIA CARDIACA

La Hb produce un descenso significativo en la FC ( $p = 0,0002$ ). Esta acción afecta de una forma análoga en el grupo control y en el séptico (Tiempo \* sepsis:  $p = 0,12$ ). En el grupo control la FC basal de  $127,8 \pm 18,1$  latidos/min pasa a  $94,2 \pm 33,5$  latidos/min tras la primera dosis de Hb (este descenso es estadísticamente significativo:  $p = 0,01$ ). Posteriormente este descenso no se mantiene de tal forma que en las dosis posteriores no es significativo el descenso de FC, ni respecto a la basal ni con respecto a las dosis previas. Es decir, el efecto sobre la FC no es dosis-dependiente en el grupo control. En el grupo séptico se produce igualmente un descenso significativo de la FC en la primera dosis ( $p=0,03$ ), este efecto no se mantiene posteriormente, ya que la FC para las dosis de 200 y 400 mg/kg/h no varía significativamente con respecto a la basal. Sin embargo, el cambio que se produce globalmente en el grupo séptico es significativo ( $p = 0,006$ ) aunque no dosis-dependiente.

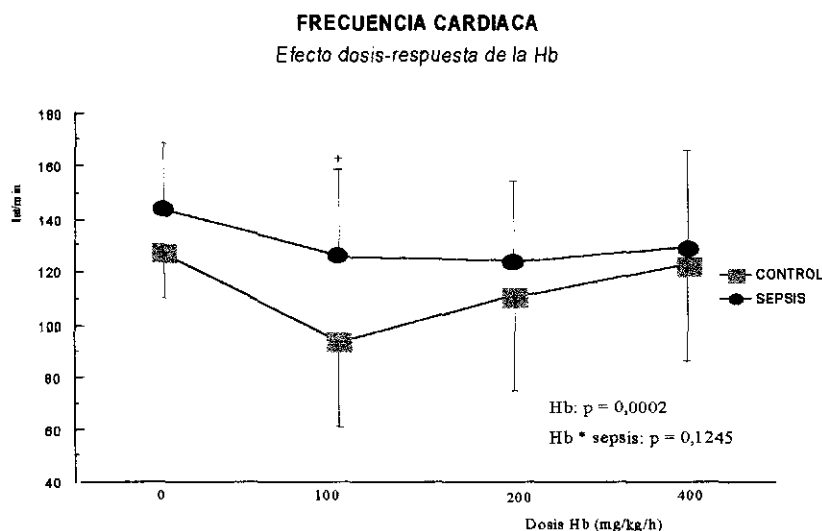
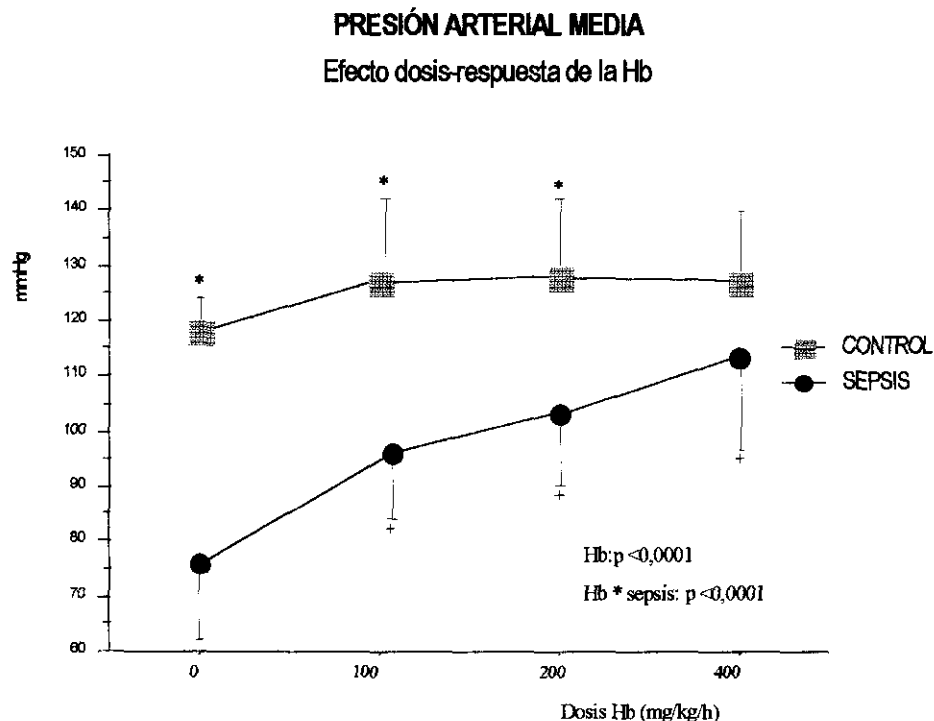


Fig R43: Acción de las diferentes dosis de Hb sobre la FC. La Hb produce un descenso significativo de la FC, tanto en el grupo control (■) como en el séptico (●).

## B) EFECTO SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL

La Hb produce un intenso incremento de la PAM ( $p < 0,0001$ ). Sin embargo, esta acción se manifiesta de forma muy diferente en ambos grupos (Tiempo \* sepsis:  $p < 0,0001$ ). Analizando la diferencia entre los dos grupos, ésta es estadísticamente significativa en el momento previo a la infusión (obviamente por el efecto de la sepsis) y en las dosis de 100 y 200 mg/kg/h, sin embargo en el momento de la dosis 400 mg/kg/h, la PAM alcanza los valores muy próximos a los del grupo control en estado previo lo que pone de manifiesto que la Hb se comporta como un resucitador eficaz restaurando la PAM a valores de animales no sépticos. El efecto de la Hb para la PAM sí es dependiente de la dosis ya que en el grupo séptico se observa como en la primera dosis hay un incremento significativo respecto a la basal ( $p: \sim 0,0006$ ) y en el momento de la dosis de 200 mg/kg/h el incremento de la PAM también es significativo con respecto a la dosis previa ( $p: \sim 0,0006$ ). Esto muestra que aunque el efecto sobre la PAM es dosis-dependiente para dosis bajas, no llega a producir aumentos de la PAM a valores que superen de manera importante la normalidad, lo que supone una ventaja importante terapéutica.



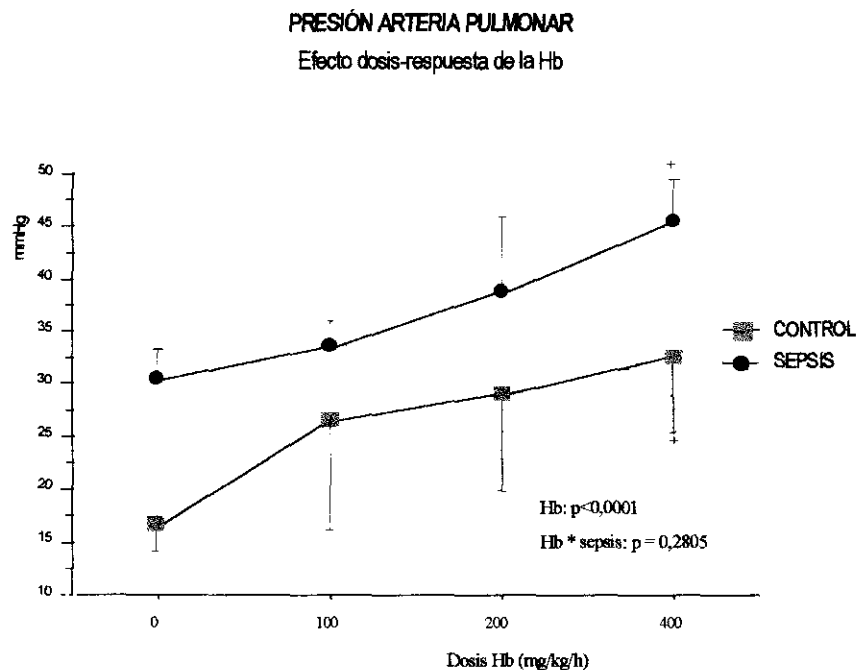
**Fig R44: Acción de las diferentes dosis de Hb sobre la PAM: La Hb produce un incremento significativo de la PAM. Este incremento es más acusado en el grupo séptico (\*).**

(\*) = diferencia estadísticamente significativa frente al grupo séptico.

(+) = diferencia estadísticamente significativa con la PAM previa a la administración de Hb.

## B) ACCIÓN sobre la PRESIÓN en la ARTERIA PULMONAR

La Hb produce un incremento importante de la PAP (Hb:  $p < 0,0001$ ). Como puede apreciarse en la figura este incremento ocurre de manera paralela en ambos grupos. De hecho, la influencia en la evolución de la PAP no es significativamente diferente en función de la presencia o no se sepsis (Hb \* sepsis:  $p = 0,2805$ ). En el grupo control provoca un incremento significativo de la PAP ( $p = 0,0008$ ). Este efecto, como puede verse en la figura es progresivo, si bien tan solo en el momento de la dosis máxima alcanza un nivel estadísticamente significativo con respecto al basal ( $p = 0,0204$ ). En el grupo séptico el efecto es análogo, se parte de una PAP previa de 30,3 mmHg alcanzada a lo largo de las cuatro horas de evolución séptica y en un periodo de 45' de administración de Hb llega a 45,3 mmHg ( $p < 0,0001$ ). Este valor se alcanza progresivamente a medida que aumenta la dosis de Hb, si bien la diferencia no es significativa con respecto al valor basal hasta la dosis máxima ( $p \sim 0,0006$ ).

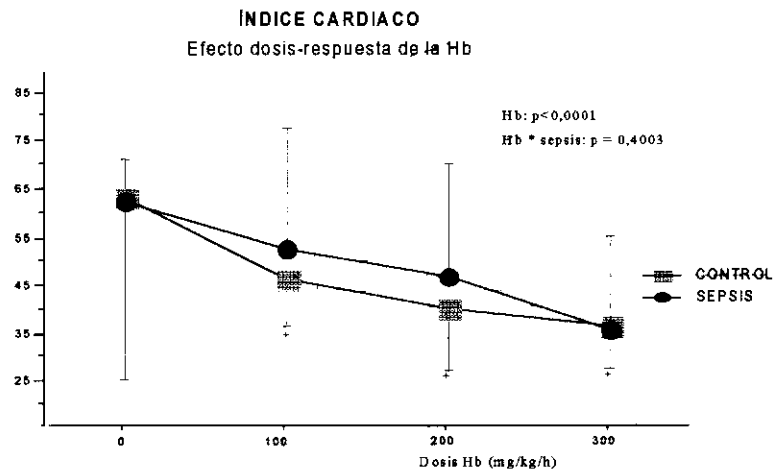


**Fig R45: Acción de las diferentes dosis de Hb sobre la PAP: La Hb produce un incremento significativo de la PAP, tanto en el grupo control (■) como en el séptico (●).**

## D) ACCIÓN SOBRE EL ÍNDICE CARDIACO

La Hb produce un descenso significativo ( $p < 0,0001$ ) del IC. Como puede observarse en la figura, este descenso tiene lugar tanto en el grupo séptico como en el grupo control (Hb \* sepsis:  $p$  NS). La Hb comienza a ejercer su efecto sobre el IC a dosis

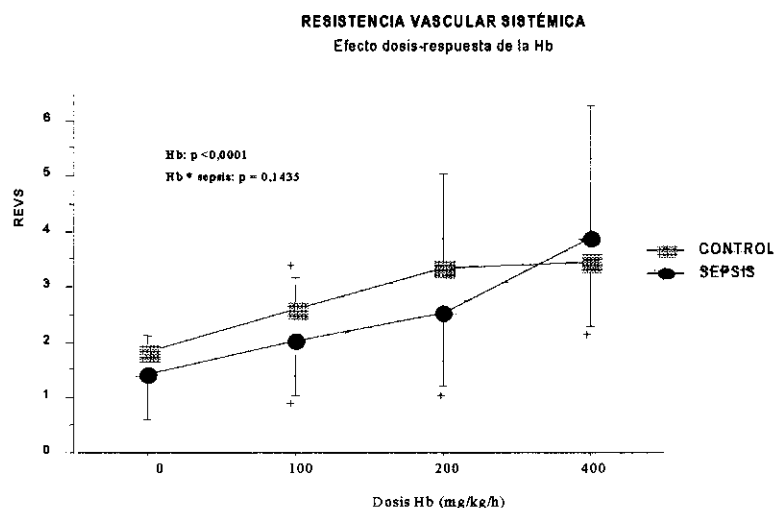
de 100 y 200 mg/mL/kg en los animales control, observándose diferencias significativas con respecto al IC que presentaban previamente. En los animales sépticos se observa una tendencia al descenso menos pronunciada, tan solo en la última dosis se alcanzan valores de IC diferenciables de los que presentaba previos a la administración de Hb.



**Fig R46: Acción de las diferentes dosis de Hb sobre el IC:** La Hb produce un descenso significativo del IC, tanto en el grupo control (■) como en el séptico (●).

### E) ACCIÓN de la Hb en la RVS

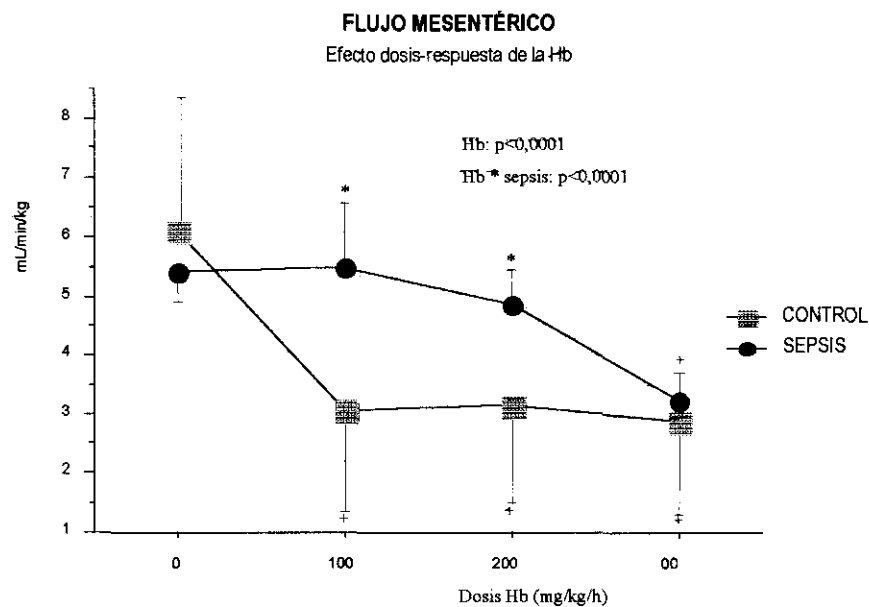
La Hb produce un incremento significativo de la RVS (Hb:  $p < 0,0001$ ). Este incremento se produce en el grupo séptico (Hb:  $p = 0,001$ ) y en el grupo control (Hb:  $p = 0,0002$ ), no existiendo diferencias significativas en el comportamiento dependiendo de la presencia de sepsis (Hb \* sepsis:  $p$  NS). Como puede observarse en la figura R47, el incremento respecto a la medida previa es significativo (+) a partir de la primera dosis.



**Fig R47: Acción de las diferentes dosis de Hb sobre la RVS:** La Hb produce un incremento significativo de la RVS, tanto en el grupo control (■) como en el séptico (●). A partir de la primera dosis el incremento es significativo con respecto a la medida previa a la administración de Hb (+).

## F) EFECTOS DE LA Hb SOBRE EL Qmes.

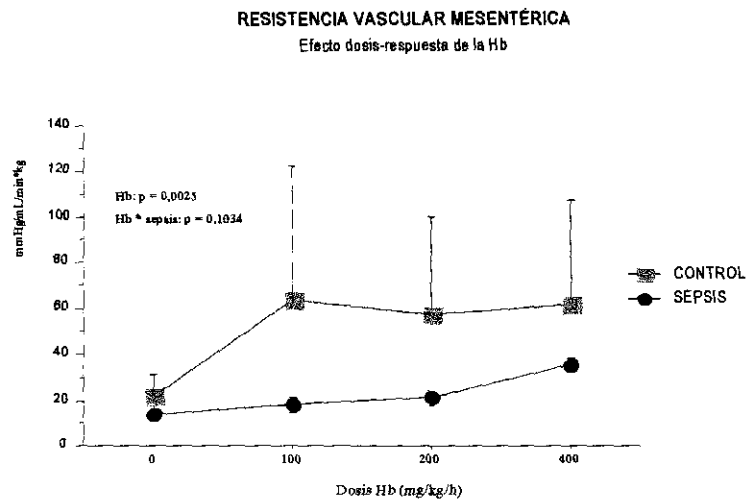
La Hb provoca un descenso significativo del Qmes (Hb:  $p < 0,0001$ ). Sin embargo, el comportamiento del grupo séptico no es el mismo que el del grupo control (Hb \* sepsis:  $p < 0,0001$ ). En el grupo control se produce un descenso significativo para la dosis de 100 mg/kg/h y para dosis superiores se mantiene dicho descenso. Sin embargo, en el grupo séptico el descenso es paulatino, siendo estadísticamente significativa la diferencia con respecto a la medida de dosis 0 (+) para la dosificación de 400 mg/kg/h.



**Fig R48: Acción de las diferentes dosis de Hb sobre el Qmes.** La Hb produce un descenso significativo del Qmes, tanto en el grupo control (▨) como en el séptico (\*). En el grupo control el descenso, con respecto a la medida previa a la administración de Hb, es significativo (+) a partir de la primera dosis. (\*): diferencia significativa con respecto al grupo control

## G) ACCIÓN DE LA Hb SOBRE LA RVM.

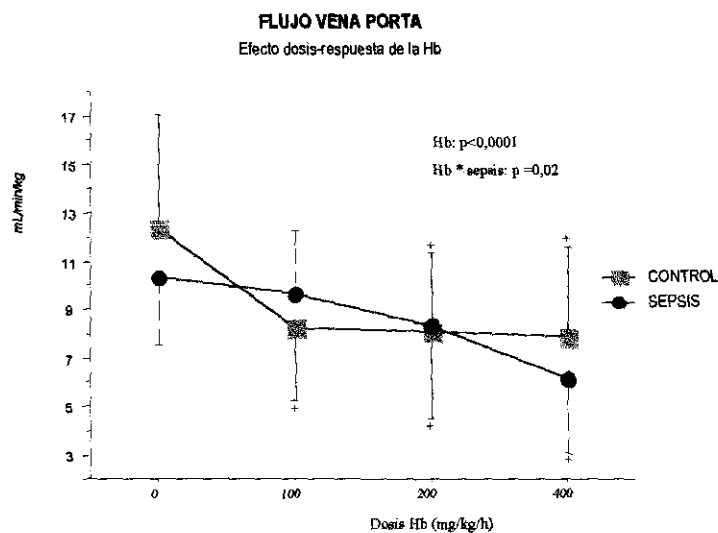
La Hb produce un incremento significativo en la RVM (Hb:  $p = 0,0025$ ). Este comportamiento no difiere dependiendo de la presencia de sepsis (Hb \* sepsis:  $p$  NS). Como puede observarse en la figura, al igual que sucede con el Qmes, la variación en el grupo control se produce desde la dosis de 100 mg/kg/h, mientras que en el grupo séptico el incremento es máximo para la dosis de 400 mg/kg/h.



**Fig R49: Acción de las diferentes dosis de Hb sobre la RVM:** La Hb produce un incremento significativo de la RVM tanto en el grupo control (■) como en el séptico (●).

**H) EFECTOS DE LA HB SOBRE EL Qp.**

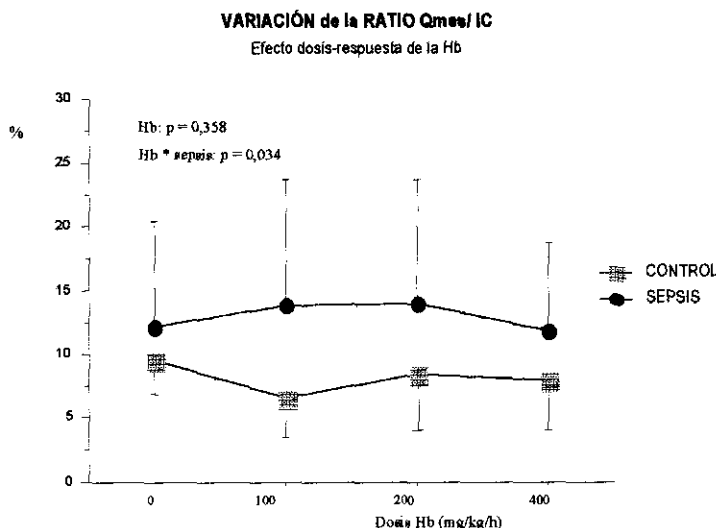
La Hb provoca un descenso significativo del Qp (Hb:  $p < 0,0001$ ). Sin embargo, el comportamiento del grupo séptico no es el mismo que el del grupo control (Hb \* sepsis:  $p = 0,02$ ). En el grupo control se produce un descenso significativo para la dosis de 100 mg/kg/h y para dosis superiores se mantiene dicho descenso. Sin embargo, en el grupo séptico el descenso es paulatino, siendo estadísticamente significativa la diferencia con respecto a la medida de dosis 0 (+) para la dosificación de 200 y 400 mg/kg/h.



**Fig R50: Acción de las diferentes dosis de Hb sobre el Qp:** La Hb produce un descenso significativo del Qp, tanto en el grupo control (■) como en el séptico (●). En el grupo control el descenso, con respecto a la medida previa a la administración de Hb, es significativo (+) a partir de la primera dosis.

**I) EFECTO DE LA Hb sobre la RATIO Qmes/IC.**

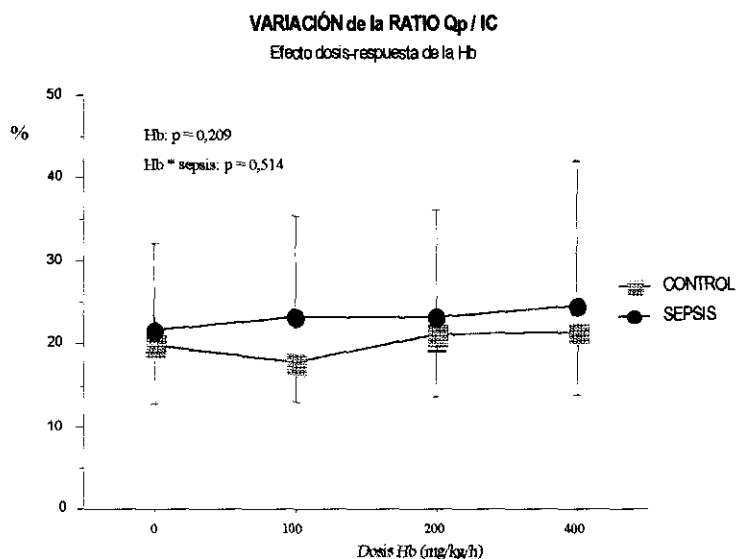
La Hb no produce cambios significativos en la ratio Qmes/IC (Hb: p NS); es decir, no afecta a la distribución de flujo a nivel de la arteria mesentérica.



**Fig R51:** Acción de las diferentes dosis de Hb sobre la ratio Qmes/IC: La Hb no produce cambios significativos, tanto en el grupo control (■) como en el séptico (●).

**J) EFECTO DE LA Hb sobre la RATIO Qp/IC.**

La Hb no produce cambios significativos en la ratio Qp/IC (Hb: p NS); es decir, no afecta a la distribución de flujo a nivel de la vena porta.



**Fig R52:** Acción de las diferentes dosis de Hb sobre la ratio Qp/IC: La Hb no produce cambios significativos, tanto en el grupo control (■) como en el séptico (●).

Los efectos de la Hb que se han expuesto en este apartado pueden resumirse en:

### **EFFECTO DOSIS-RESPUESTA de la Hb**

- **EFFECTOS SISTÉMICOS:**

- ↑PAM dosis-dependiente en el grupo séptico, alcanzándose un valor equiparable al del grupo no séptico antes de administrar Hb.
- ↑ PAP dosis-dependiente, tanto en el grupo control como en el séptico.
- ↓ IC dosis-dependiente en ambos grupos.

- **ACCIONES REGIONALES:**

- ↓  $Q_{mes}$ :
  - sepsis: el descenso es significativo para la dosis 400mg/kg/h.
  - control: el descenso se produce con la dosis más baja.
- ↑ RVM.
- ↓  $Q_p$ :
  - sepsis: el descenso es significativo para las dosis de 200 y 400 mg/kg/h.
  - control: el descenso se produce con la dosis más baja.
- No se producen cambios en las ratios referentes a distribución de flujo:  $Q_{mes}/IC$  y  $Q_p/IC$ .

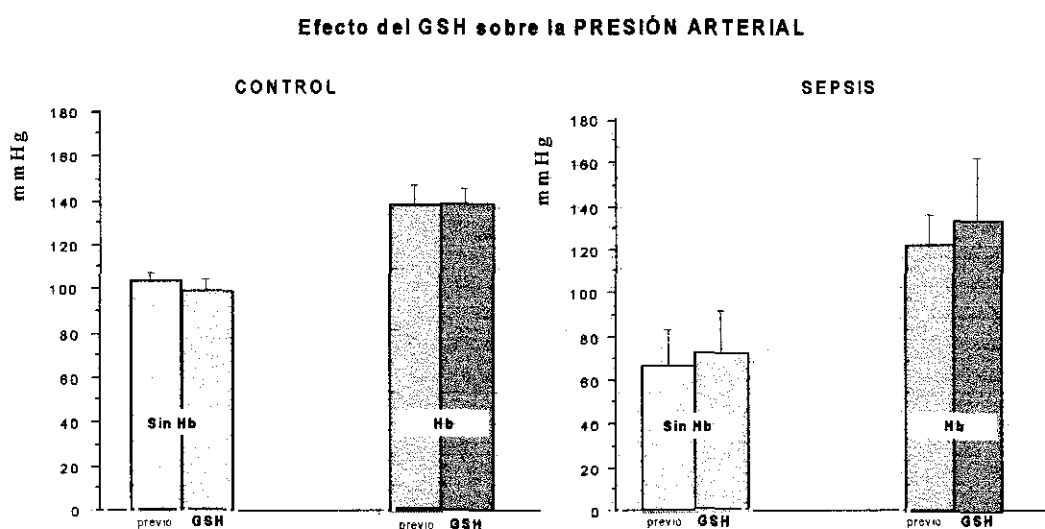


## EFFECTOS HEMODINÁMICOS del GSH

Como ya se ha expuesto en apartados previos, el objetivo fundamental de este trabajo es testar la hipótesis de que el GSH, como molécula intraeritrocitaria que contiene grupos tiol, puede “competir” con la Hb por el NO. Este supuesto se basa en el hecho de que parte del NO que se une a la Hb lo hace a través de los grupos –SH de las cisteínas que contiene la Hb. Para comprobar si el GSH “compite” con la Hb por el NO, vamos a comprobar si éste es capaz de revertir las acciones hemodinámicas de la Hb.

### A) EFECTO del GSH sobre la PRESIÓN ARTERIAL MEDIA

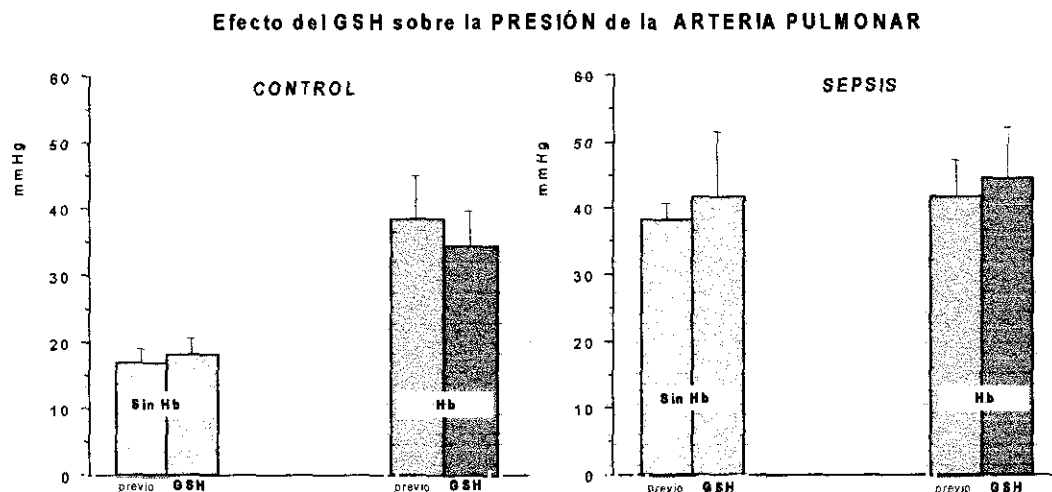
El GSH no produce cambios significativos sobre la presión arterial (GSH: p NS). Esta ausencia de cambios tiene lugar tanto en animales tratados con Hb (GSH \* Hb: p NS) como en los no tratados (GSH \* Hb: p NS). El grupo no séptico tratado con Hb posee un valor medio de PAM de  $137,6 \pm 9,2$  mmHg que se mantiene en un valor de  $137,5 \pm 7,3$  mmHg tras la infusión del glutatión. De una forma similar sucede en el grupo séptico tratado con Hb; el valor de PAM previo fue de  $123 \pm 13,5$  mmHg y  $134,3 \pm 29,0$  mmHg al minuto de la infusión de glutatión. El glutatión por lo tanto no revierte el efecto hipertensor de la Hb y como puede verse en la figura R53 tampoco tiene efectos sobre la PAM en ausencia de ésta.



**Fig R53.- Efectos del GSH sobre la PAM:** el GSH no produce cambios significativos en ninguno de los grupos estudiados. Los efectos comparados han sido los valores que presentaban antes del bolo de GSH (previo) y los observados al minuto de su administración (GSH).

### C) EFECTO del GSH sobre la PAP

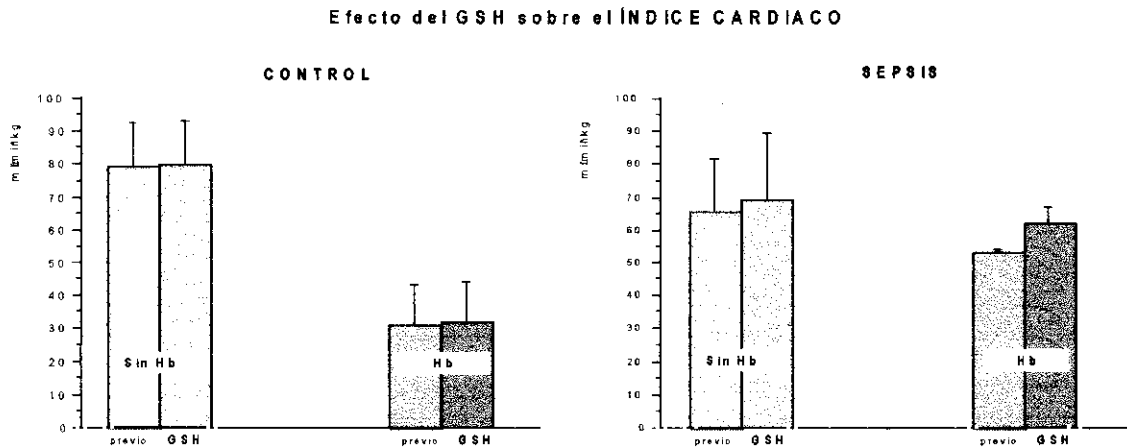
El glutatión no produce cambios significativos sobre la presión de la arteria pulmonar (GSH: p NS). Este efecto tiene lugar tanto en los animales que reciben Hb (p NS) como en aquellos no tratados (p NS). El glutatión no revierte por lo tanto el efecto hipertensor de la Hb en el pulmón ni ejerce ningún efecto significativo en ausencia de ésta.



**Fig R54.- Efectos del GSH sobre la PAP:** el GSH no produce cambios significativos en ninguno de los grupos estudiados. Los efectos comparados han sido los valores que presentaban antes del bolo de GSH (previo) y los observados al minuto de su administración (GSH).

### D) ACCION sobre el ÍNDICE CARDIACO

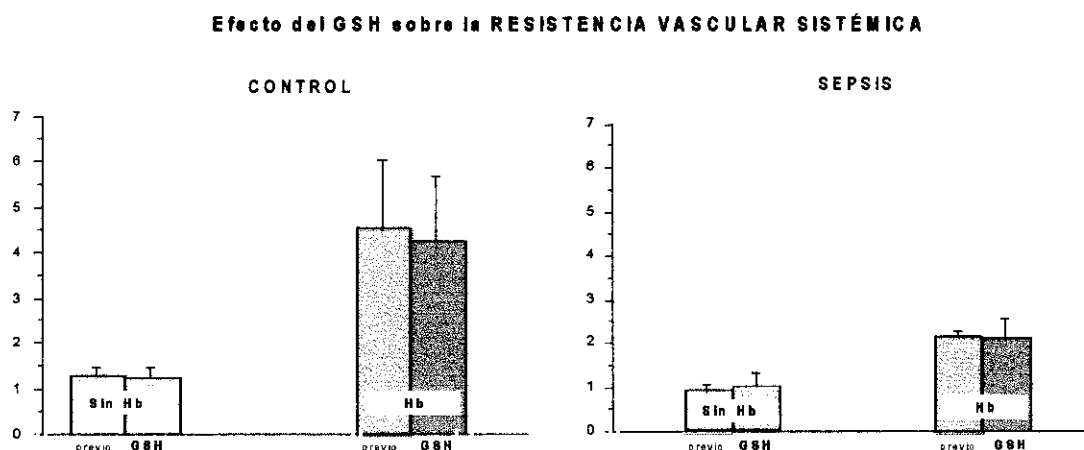
El glutatión produce un leve pero significativo incremento del IC los animales tratados con Hb (GSH p: 0,0041). Este efecto, como puede observarse en la figura, se debe al incremento que se tiene lugar en el grupo séptico (de  $53,4 \pm 0,8$  mL/min/kg a  $62,0 \pm 5,2$  mL/min/kg) (GSH \* sepsis: p = 0,016). El incremento del IC junto con el mantenimiento de la PAM puede generar un cierto descenso, aunque no llega a ser significativo, de la elevada resistencia vascular inducida por la Hb. En cambio, en el grupo que no recibe Hb no se producen cambios significativos en el índice cardiaco (GSH: p NS) ni existe interacción entre el efecto del GSH y la sepsis (GSH \* sepsis: p NS); es decir, el GSH se comporta de manera análoga tanto en el grupo control como en el séptico. En el grupo control que no recibe Hb el glutatión mantiene el IC, el valor medio de IC pasa de  $79,1 \pm 13,7$  mL/min/kg a  $79,4 \pm 13,6$  mL/min/kg. En el grupo séptico tampoco tienen lugar cambios en el IC.



**Fig R55.- Efectos del GSH sobre el IC:** el GSH produce cambios leves pero significativos en séptico tratado con Hb. Los efectos comparados han sido los que presentaban antes del bolo de GSH (previo) y los observados al minuto de su administración (GSH).

**E) EFECTOS del GSH sobre la RESISTENCIA VASCULAR SISTÉMICA**

El glutatión no produce cambios significativos en la resistencia vascular sistémica tanto en los grupos tratados previamente con Hb (GSH: p NS), como en aquellos que no recibieron tratamiento (GSH: p NS). Sin embargo, aunque no es significativa la variación, se observa una cierta tendencia al descenso de la RVS en los animales tratados con Hb. El efecto del glutatión sobre la RVS no depende de la presencia de sepsis ni en los animales tratados ni en aquellos que no reciben Hb (reciben Hb: GSH \* sepsis: p NS y en los que no sometidos a tratamiento: GSH \* sepsis: p NS).



**Fig R56.- Efectos del GSH sobre la RVS:** el GSH no produce cambios significativos en ninguno de los grupos estudiados. Los efectos comparados han sido los que presentaban antes del bolo de GSH (previo) y los observados al minuto de su administración (GSH).

## F) EFECTO del GLUTATION sobre FLUJO MESENTÉRICO

El GSH produce un incremento significativo en el flujo mesentérico ( $p < 0,0001$ ). Este efecto, es fuertemente dependiente de la administración concomitante de Hb (GSH \* Hb:  $p = 0,0004$ ).

### a) Grupo de animales tratados con Hb

Como puede observarse en la figura R57, en los animales tratados con Hb el GSH produce un incremento intenso del flujo mesentérico (GSH:  $p = 0,0005$ ):

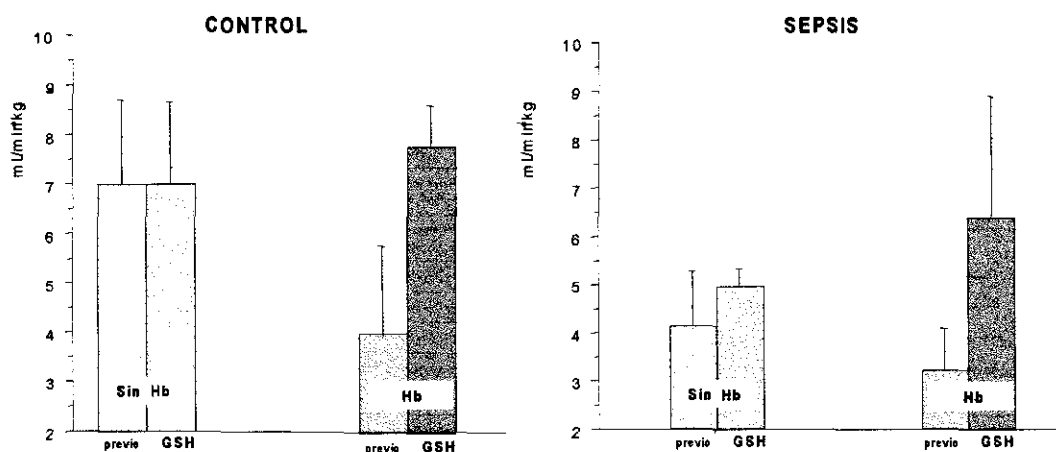
- **Grupo no séptico tratado con Hb:** en el grupo control el aumento de flujo mesentérico medio fue de  $4,0 \pm 1,8$  mL/min/kg a  $7,8 \pm 0,8$  mL/min/kg. Este incremento sitúa los niveles de flujo mesentérico en valores próximos a los correspondientes a los flujos de los animales no reciben Hb. Es decir, se alcanza un flujo mesentérico medio posterior al glutation ( $7,7 \pm 0,8$  mL/min) comparable al del flujo control que no recibe Hb ( $7,0 \pm 1,6$  mL/min). Este hecho revela que el GSH es capaz de revertir el efecto de la Hb como sustancia que provoca una disminución en el flujo de la región mesentérica.
- **Grupo séptico con Hb:** el cambio que se produjo en el flujo mesentérico fue de  $3,2 \pm 0,9$  mL/min/kg a  $6,4 \pm 2,5$  mL/min/kg. Este incremento producido por la administración de GSH conduce a un valor de flujo ( $6,4 \pm 2,51$  mL/min/kg) superior al correspondiente al grupo séptico que no recibe Hb ( $4,12 \pm 1,2$  mL/min/kg). Esto pone de manifiesto que, a diferencia de lo que ocurre en el grupo control, el GSH no solo aumenta el flujo revirtiendo el efecto de la Hb sino que aún lo incrementa más.

### b) Grupo de animales NO tratados con Hb

En los animales no tratados con Hb el GSH no produce globalmente modificaciones significativas en el flujo mesentérico (GSH:  $p$  NS). Sin embargo, cabe destacar que en el grupo séptico el GSH produce un incremento de flujo de un valor medio previo de  $4,1 \pm 1,2$  mL/min/kg hasta un valor medio de  $4,9 \pm 0,3$  mL/min/kg. Este comportamiento

diferencial del grupo séptico con respecto al grupo control no llega a ser estadísticamente significativo (GSH \* sepsis:  $p=0,065$ ), pero sí es relevante ya que la variación que se produce en el grupo control es prácticamente inexistente (de  $7,01 \pm 1,6$  mL/min/kg a  $7,003 \pm 1,6$  mL/min/kg).

#### Efecto del GSH sobre el FLUJO MESENTÉRICO



**Fig. R57.- Efectos del GSH sobre el Qmes:** El GSH produce un importante incremento del Qmes en los animales tratados con Hb ( $p=0,0005$ ), revirtiendo el efecto de la Hb. Los efectos comparados han sido los valores que presentaban antes del bolo de GSH (previo) y los observados al minuto de su administración (GSH).

#### G) EFECTO DEL GLUTATION SOBRE EL FLUJO PORTAL

El GSH produce un incremento significativo del flujo portal (GSH:  $p<0,0001$ ). Este efecto es intensamente dependiente de que los animales hayan sido tratados con Hb (GSH \* Hb:  $p<0,0001$ ).

##### a) Grupo de animales tratados con Hb

El glutatión produce un aumento significativo del flujo portal (GSH:  $p<0,0001$ ) en ambos grupos, no dependiendo de la presencia de sepsis (GSH \* sepsis:  $p = 0,1535$ ).

- **Grupo control con Hb:** Este grupo presenta un flujo portal medio antes de la administración de GSH de  $5,3 \pm 0,4$  mL/min/kg que por efecto del GSH pasa a un flujo

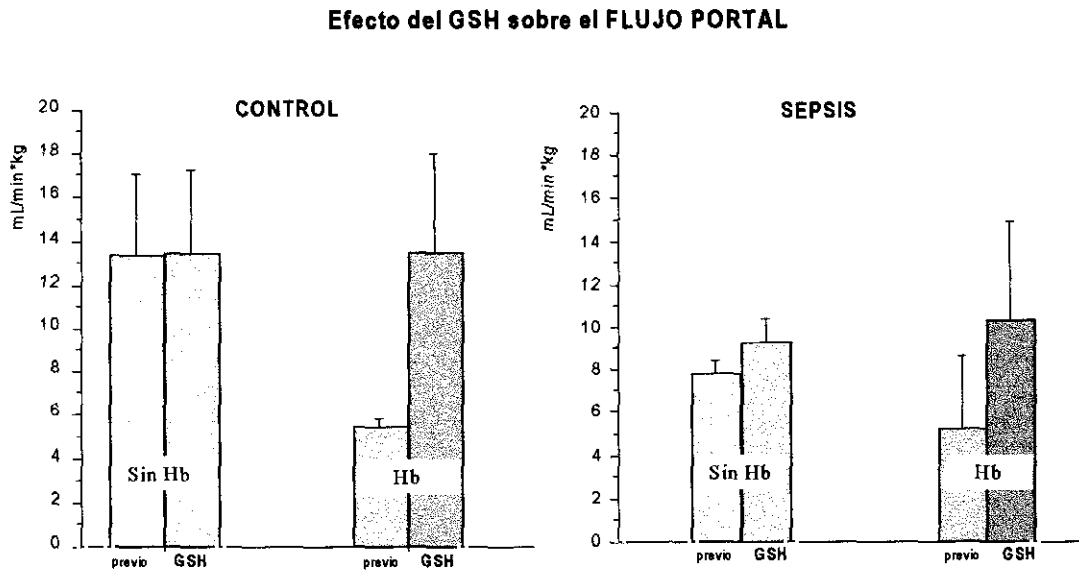
portal medio de  $13,4 \pm 4,6$  mL/min/kg. Este incremento implica alcanzar un flujo portal medio comparable al del grupo control que no recibe Hb ( $13,3 \pm 3,7$  mL/min/kg). Este hecho pone de manifiesto que el GSH es capaz de revertir en su totalidad el efecto de la Hb sobre el flujo portal.

- **Grupo séptico con Hb:** El flujo portal medio que precede al bolo de glutathione es en este grupo de  $5,2 \pm 3,4$  mL/min/kg que por la acción del GSH se incrementa a un valor medio de  $10,3 \pm 4,5$  mL/min/kg. Este valor alcanzado de flujo medio portal es superior al correspondiente del grupo séptico que no recibe Hb ( $7,8 \pm 0,6$  mL/min/kg); es decir, el GSH no solo revierte los efectos de la Hb sobre el flujo portal sino que ocasiona un flujo portal medio mayor.

#### a) Grupo de animales NO tratados con Hb

En este grupo se observa un comportamiento diferencial dependiendo de la existencia de sepsis (GSH \* sepsis:  $p = 0,03$ ).

- **Grupo control** Como puede observarse en la figura, el GSH no produce variación en este grupo en el flujo portal medio. La media de flujo portal que precedía a la administración del GSH era de  $13,3 \pm 3,7$  mL/min/kg y tras el GSH no sufre variación ya que el valor medio fue de  $13,4 \pm 3,9$  mL/min/kg.
- **Grupo séptico.** A diferencia de lo que sucede en el grupo control, en el grupo séptico el GSH produce un incremento significativo ( $p = 0,05$ ) del flujo portal medio. El incremento que se produce es de un valor medio de flujo portal de  $7,8 \pm 0,6$  mL/min/kg a  $9,3 \pm 1,1$  mL/min/kg.



**Fig R58.- Efectos del GSH sobre el Qp:** El GSH produce un importante incremento del Qp en los animales tratados con Hb ( $p < 0,0001$ ), revirtiendo el efecto de la Hb. Los efectos comparados han sido los valores que presentaban antes del bolo de GSH (previo) y los observados al minuto de su administración (GSH).

## H) EFECTO del GSH sobre la RESISTENCIA VASCULAR MESENTÉRICA

El GSH produce globalmente un descenso significativo de la resistencia mesentérica (GSH:  $p = 0,0018$ ). Este efecto es fuertemente dependiente de que haya existido tratamiento con Hb (GSH \* Hb:  $p = 0,006$ ).

### a) Grupo de animales tratados con Hb

En este grupo el GSH produce un descenso significativo de la resistencia vascular en el lecho mesentérico (GSH:  $p = 0,0067$ ). Este efecto tiene lugar de forma análoga tanto en el grupo control como en el séptico, no existiendo diferencias significativas entre el comportamiento que presentan ambos grupos (GSH \* sepsis:  $p$  NS).

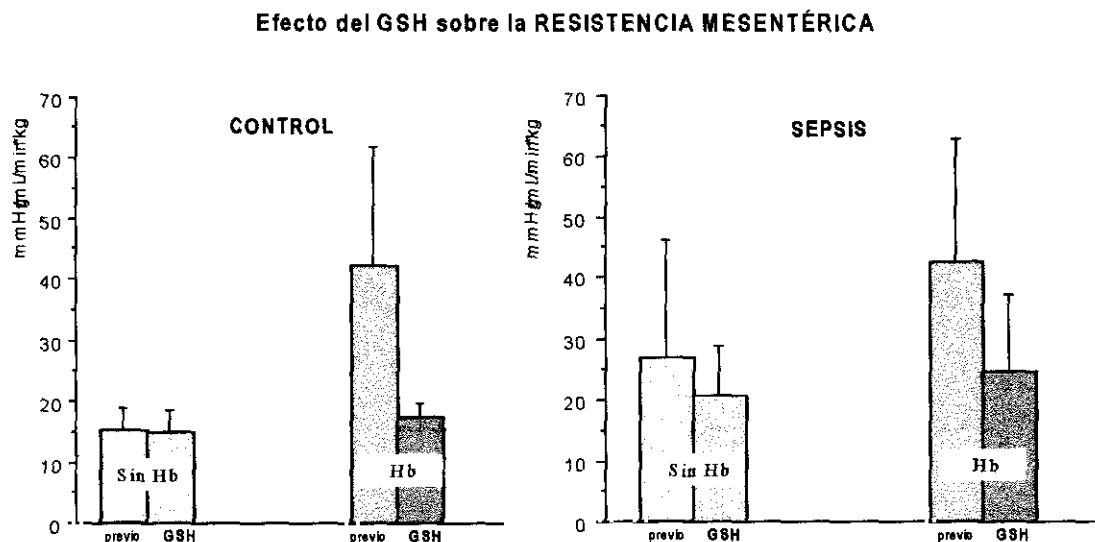
- **grupo control con Hb.** En este grupo el GSH produce un descenso de resistencia vascular mesentérica media de un valor medio de  $42,1 \pm 19,8$  mmHg/mL/min\*kg a  $17,6 \pm 2,1$  mmHg/mL/min\*kg. Este descenso sitúa el valor de la resistencia mesentérica en un valor próximo al del grupo control que no recibe Hb ( $15,3 \pm 3,7$

mmHg/mL/min\*kg); es decir, el GSH revierte prácticamente en su totalidad el efecto de la Hb sobre la resistencia mesentérica.

- **Grupo séptico con Hb.** En el grupo séptico el GSH produce un descenso de la resistencia vascular mesentérica de un valor previo de  $42,7 \pm 20,1$  mmHg/mL/min\*kg a  $24,8 \pm 12,24$  mmHg/mL/min\*kg. Este valor de RVM alcanzado por el efecto del GSH próximo al valor del grupo séptico que no recibe Hb.

#### a) Efecto sobre los animales que NO reciben Hb

En este grupo el GSH no produce cambios significativos en la RVM (GSH: p NS). Este hecho ocurre de manera análoga en el grupo control y en el séptico (GSH \* sepsis: p NS). Tan solo en el grupo séptico se observa un pequeño descenso en la RVM de  $17,41 \pm 7,8$  a  $14,7 \pm 4,3$  mmHg/mL/min\*kg, que no llega a ser estadísticamente significativo.



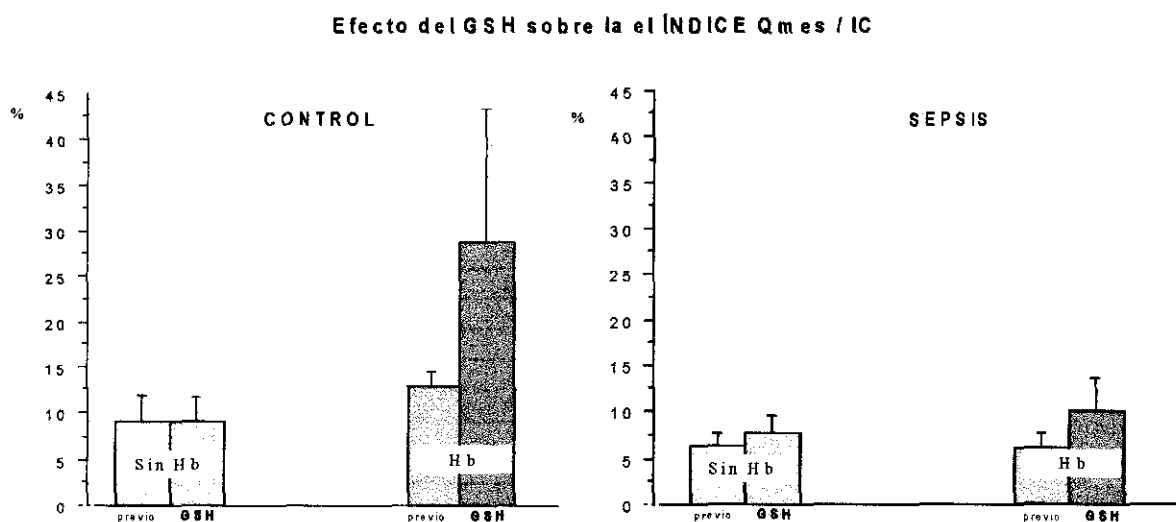
**Fig R59.- Efectos del GSH sobre la RVM:** El GSH produce un importante descenso de la RVM en los animales tratados con Hb ( $p=0,0059$ ), revirtiendo el efecto de la Hb. Los efectos comparados han sido los valores que presentaban antes del bolo de GSH (previo) y los observados al minuto de su administración (GSH).



## I) EFECTOS del GSH sobre la DISTRIBUCIÓN de FLUJO

### a) Acción sobre la ratio Qmes/IC

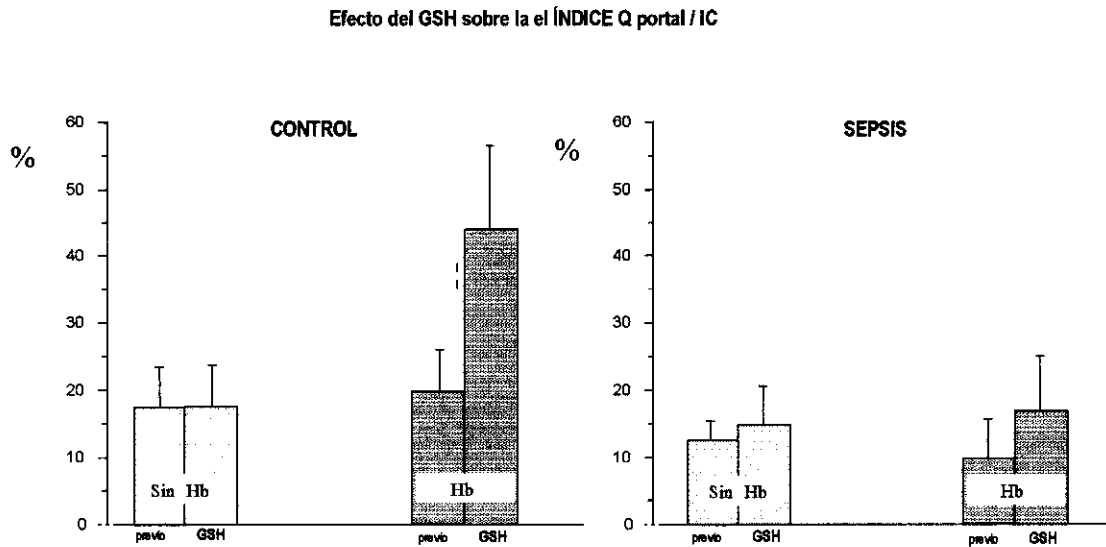
El GSH produce un importante incremento sobre el porcentaje de Qmes con respecto al flujo total (GSH:  $p=0,002$ ); es decir, el GSH altera la distribución de flujo puesto que incrementa la proporción de flujo total correspondiente a la arteria mesentérica. Como puede observarse en la figura R60, este efecto sucede en los animales tratados con Hb (GSH \* Hb:  $p = 0,0065$ ).



**Fig R60.- Efectos del GSH sobre la ratio Qmes/IC:** El GSH produce un importante incremento de la ratio Qmes/IC en los animales tratados con Hb ( $p=0,0065$ ). Los efectos comparados han sido los valores que presentaban antes del bolo de GSH (previo) y los observados al minuto de su administración (GSH).

### b) Acción sobre la ratio Qp/IC

El GSH produce un importante incremento sobre el porcentaje de Qp con respecto al flujo total (GSH:  $p=0,0026$ ); es decir, el GSH altera la distribución de flujo puesto que incrementa la proporción de flujo total correspondiente a la arteria mesentérica. Como puede observarse en la figura R61, este efecto sucede en los animales tratados con Hb (GSH \* Hb:  $p < 0,0001$ ).



**Fig R61.- Efectos del GSH sobre la ratio Qp/IC:** El GSH produce un importante incremento de la ratio Qp/IC en los animales tratados con Hb ( $p < 0,0001$ ). Los efectos comparados han sido los valores que presentaban antes del bolo de GSH (previo) y los observados al minuto de su administración (GSH).

Síntesis de las acciones observadas:

### EFFECTOS HEMODINÁMICOS del GSH

- **EFFECTOS SISTÉMICOS:**

- No altera la PAM.
- No altera la PAP.
- No altera el IC (tan solo de forma muy leve en los animales sépticos tratados con Hb).
- No altera la RVS.

- **EFFECTOS REGIONALES:**

- ↑ Qmes en animales tratados con Hb y de modo más moderado en animales sépticos que no reciben Hb.
- ↑ Qp en animales tratados con Hb y de modo más moderado en animales sépticos que no reciben Hb.
- ↓ RVM en animales tratados con Hb.
- ↑ ratio Qmes/IC en animales tratados con Hb.
- ↑ ratio Qp/IC en animales tratados con Hb.

## ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Se ha realizado un estudio de los efectos de la sepsis y del tratamiento con Hb en diferentes tejidos. Como se expone en el apartado de material y métodos, éste estudio se ha centrado en dos aspectos:

- Análisis anatomopatológico por microscopía óptica con tinción hematoxilina-eosina.
- Estudio inmunohistoquímico para medir la formación de nitrotirosina.

Para establecer una relación comparativa entre los diferentes grupos se han establecido una serie de criterios que se detallan en el apartado de material y métodos.

### 1.- ESTUDIO DEL INTESTINO DELGADO

#### A) TINCIÓN HEMATOXILINA EOSINA (microscopía óptica):

El grado de lesión tisular observado ha sido muy leve en todos los grupos, ya que clasificando el grado de lesión en una escala de 0 a 8, ningún grupo sobrepasa un valor medio de  $0,67 \pm 0,3$ . Se observan pequeñas diferencias en las manifestaciones de lesión tisular del intestino delgado en los diferentes grupos. Como podemos observar en la figura, el grupo control no presenta lesiones tisulares, mientras que los animales sépticos presentan un mayor grado de lesión al igual que sucede en los animales tratados con Hb. La diferencia que se observa entre el grupo control y el grupo control tratado con Hb es casi significativa.

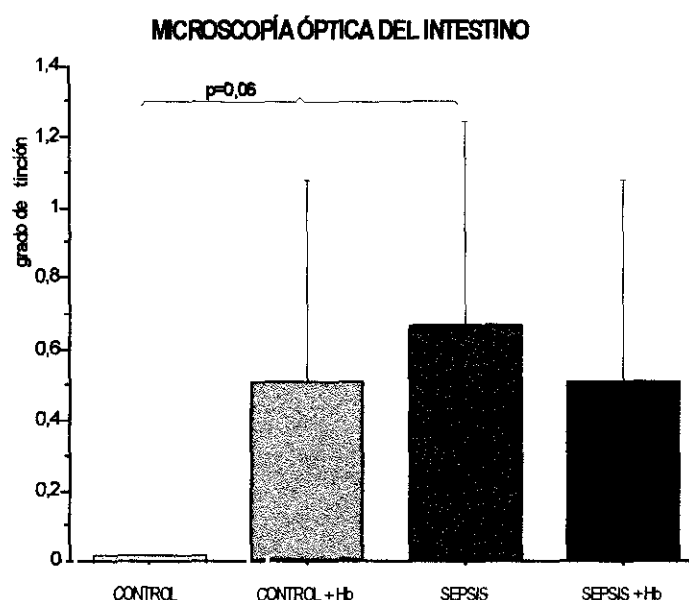


Fig R-62: Estudio histológico del intestino delgado. Se observa una diferencia significativa en los daños que produce la sepsis con respecto al grupo control.

## B) ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO: NITROTIROSINA

Se ha evaluado el grado de tinción en diferentes tipos celulares del intestino delgado.

- **células epiteliales:**

La Hb produce en el grupo control un importante incremento en el grado de tinción. Igualmente, la sepsis provoca un aumento de la tinción muy notable. Sin embargo, en el grupo séptico la Hb se comporta de modo diferente ya que en este caso la Hb produce un descenso en el grado de tinción alcanzándose un valor similar al del grupo control no tratado.

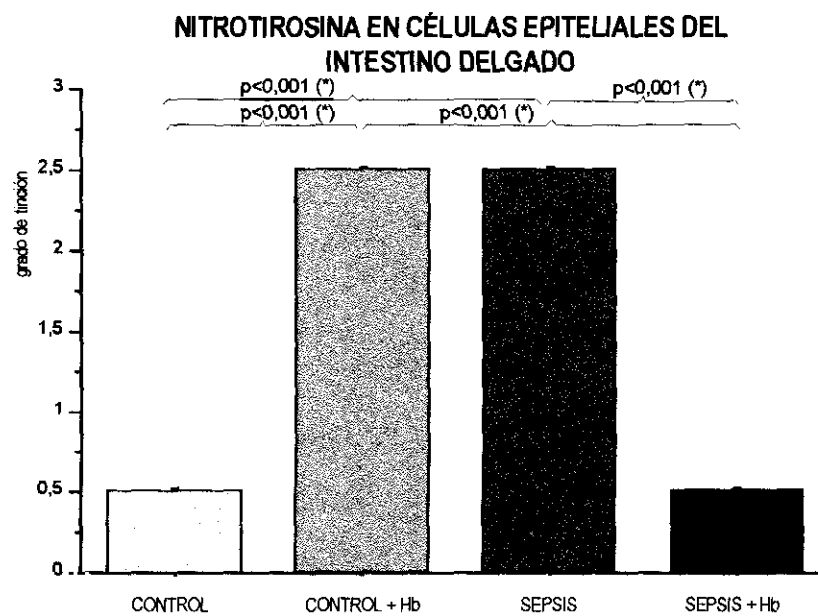


Fig R-63. Expresión tisular de nitrotirosina en las células epiteliales del intestino delgado.

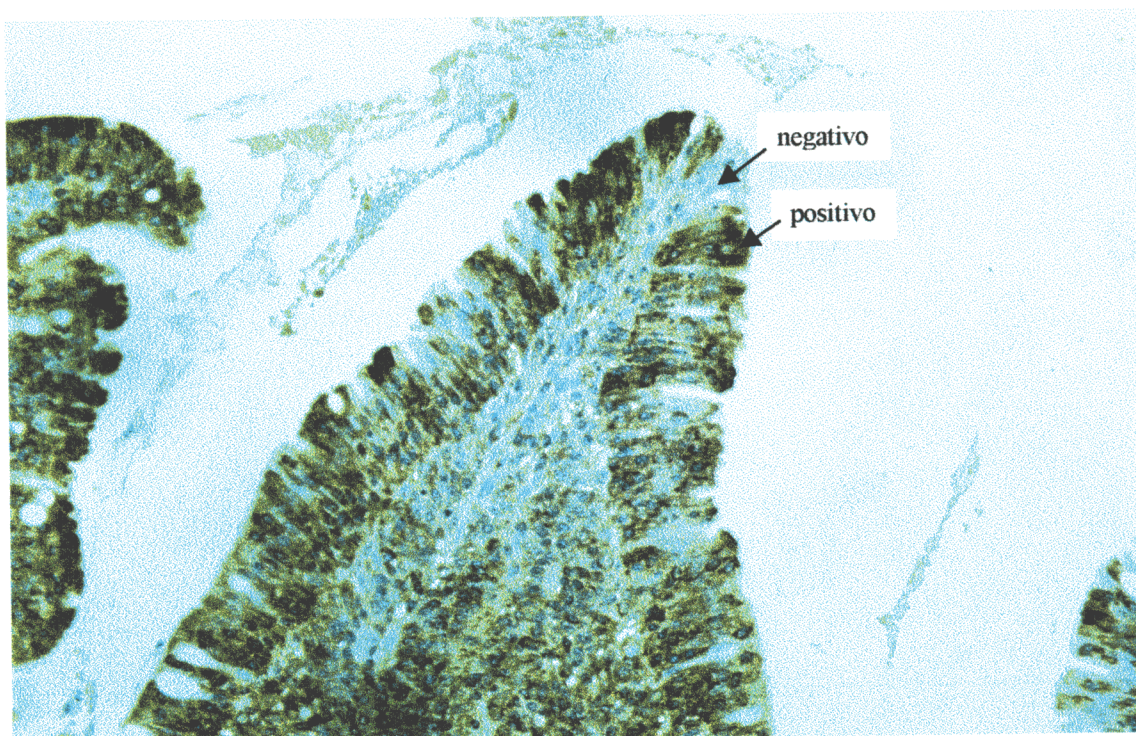


Imagen 1: muestra de un tejido correspondiente a un animal con un grado de tinción +++ . En la fotografía se puede observar la tinción de color marrón debida a la presencia de nitrotirosina.

En general se ha observado diferencia entre la tinción del epitelio superficial de la vellosidad y de las criptas. La positividad es más acentuada en el epitelio de revestimiento que en las criptas.

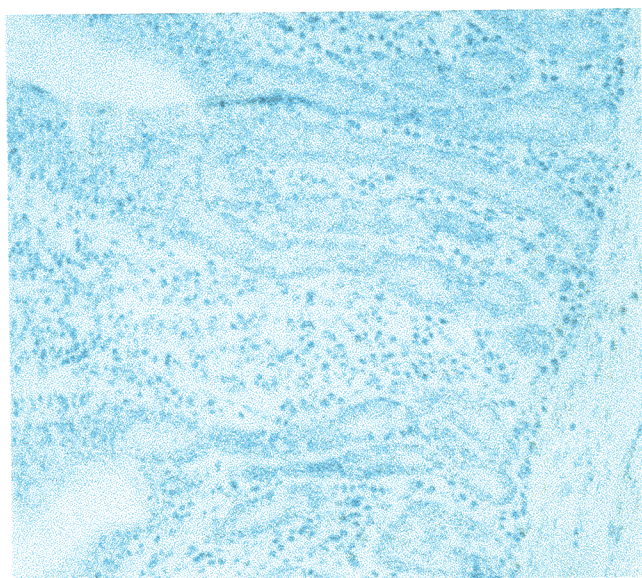


Imagen 2. Muestra de un control negativo

- **células ganglionares:**

En este tipo celular se observan importantes diferencias entre los grupos, en cuanto al grado de tinción observado. En ningún caso control se observó tinción severa mientras que en el caso de la sepsis el grado de tinción era de moderado a severo. Como se ve en la figura, el grado de tinción en el grupo control es bajo ( $1,3 \pm 0,1$ ) mientras que en el grupo control tratado con Hb es grado de tinción se incrementa de un modo importante. La sepsis produce un incremento significativo del grado de tinción con respecto al grupo control. Por el contrario, la Hb parece aminorar el grado de tinción en la sepsis ya que se produce un descenso casi significativo ( $p= 0,06$ ) en el grado de tinción con respecto al grupo séptico no tratado.

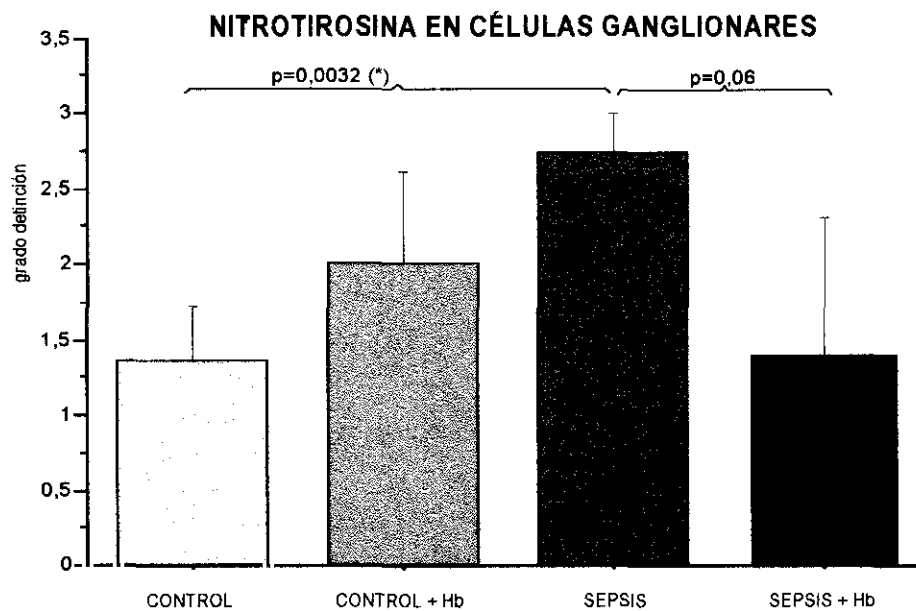


Fig R-64. Expresión tisular de nitrotirosina en las células ganglionares del intestino delgado.

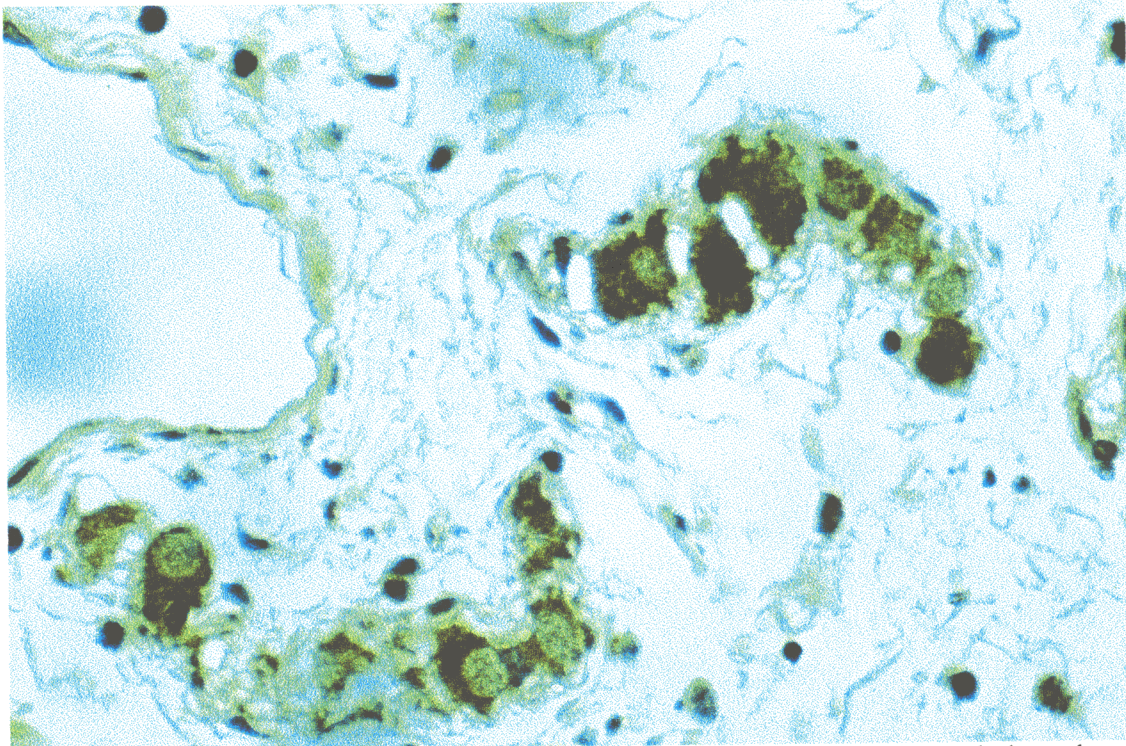


Imagen 3: muestra de un tejido correspondiente a un animal con un grado de tinción +++ . En la fotografía se puede observar la tinción de color marrón debida a la presencia de nitrotirosina.

- **músculo liso:**

En las células del músculo liso se observa que la Hb produce un incremento significativo del grado de tinción en el grupo control. Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, se observa la tendencia a incrementarse en el grupo séptico y a disminuir en los animales sépticos tratados con Hb.

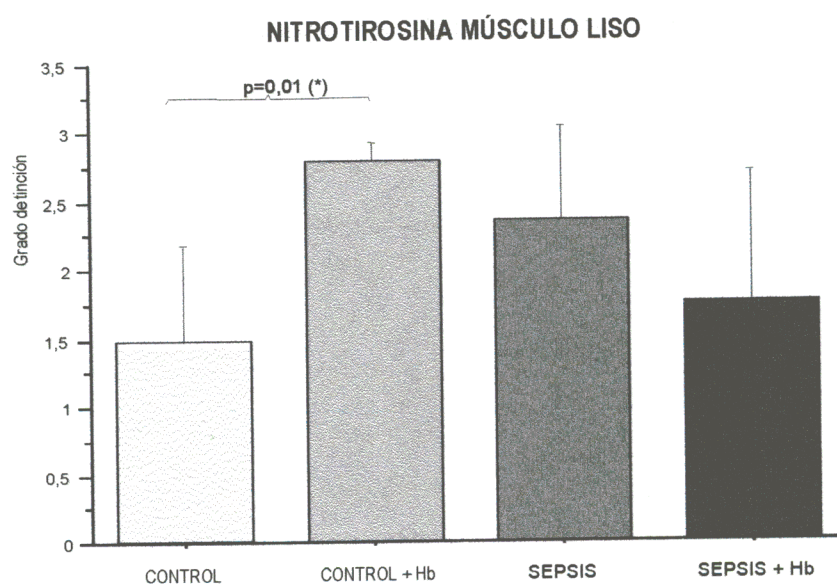


Fig R-65. Expresión tisular de nitrotirosina en las células de músculo liso en arterias del intestino delgado.

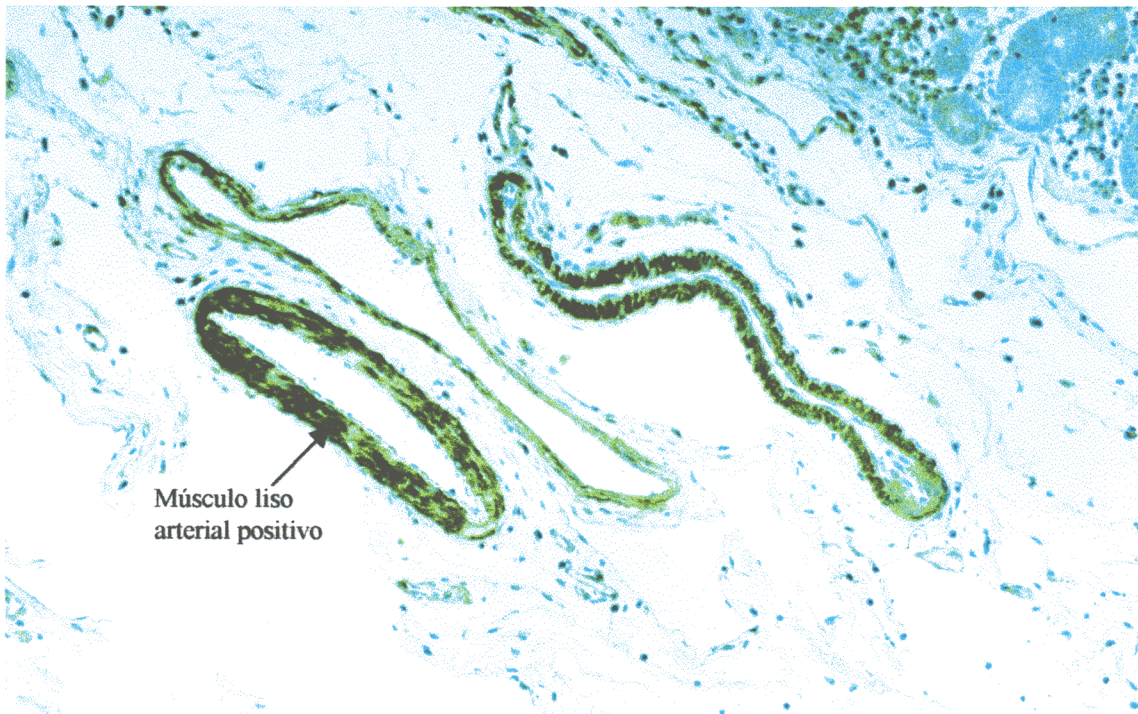


Imagen 4: muestra de un tejido correspondiente a un animal séptico con un grado de tinción +++ En la fotografía se puede comprobar la tinción de color marrón debido a la presencia de nitrotirosina.

- **capilares:**

En los capilares no se observan diferencias significativas en el grado de tinción de los diferentes grupos.

➔ ***Efecto global observado en el intestino delgado:***

Considerando la suma de los efectos observados en los diferentes tipos celulares del intestino, el comportamiento que se produce es el siguiente:

- La Hb produce un incremento significativo del grado de tinción en el grupo control.
- La sepsis incrementa de forma significativa el grado de tinción.
- La Hb mejora de forma significativa el grado de lesión mediado por  $\text{ONOO}^-$  en la sepsis.



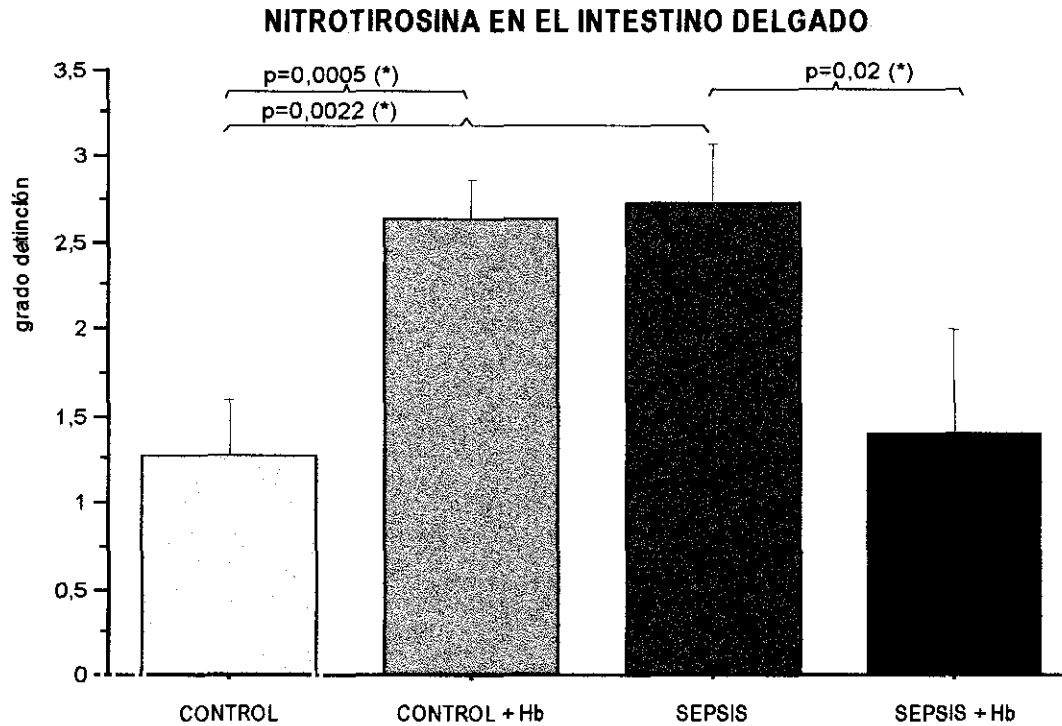


Fig R-66. Expresión tisular de nitrotirosina en el cómputo global de todos los tipos celulares del intestino delgado.

## 2.- ESTUDIO HEPÁTICO

### A) TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA (microscopía óptica):

Al contrario de lo observado en el intestino delgado, el estudio histológico del hígado realizado con tinción hematoxilina-eosina revela que existen diferencias significativas entre el grupo control y el grupo séptico. Como puede observarse en la figura, la Hb produce un cierto incremento en el grado de lesión de los animales control, aunque no es estadísticamente significativo.

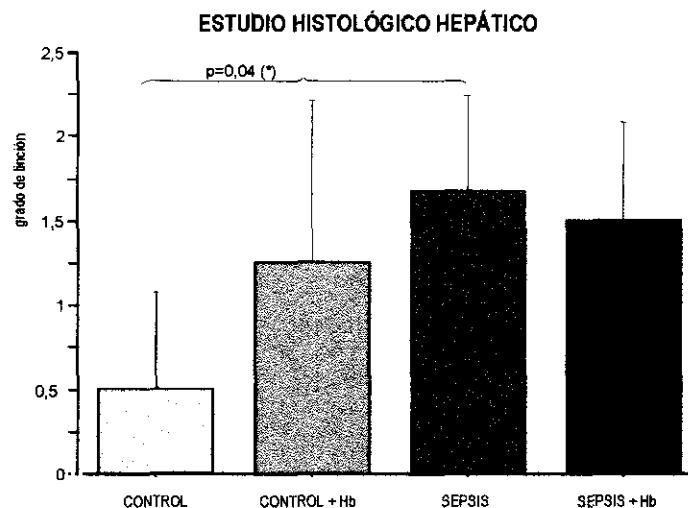


Fig R-67: Estudio de la histología hepática. La sepsis incrementa el grado de lesión de forma significativa.

## B) ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO: NITROTIROSINA

En el hígado no se observan diferencias significativas en el grado de tinción de los diferentes grupos estudiados.

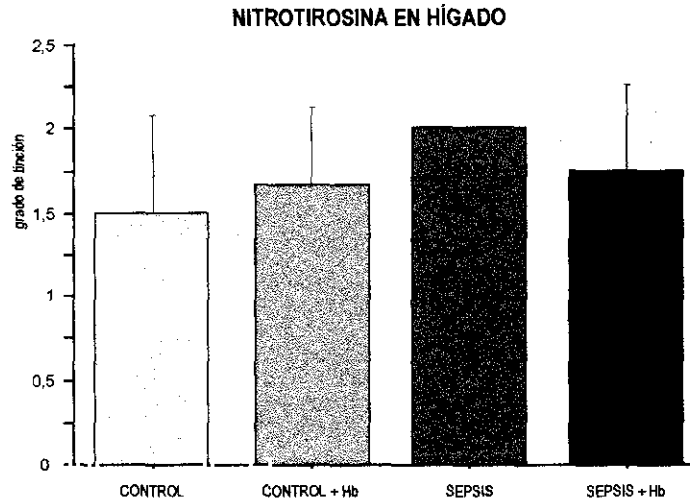


Fig R-68. Expresión tisular de nitrotirosina en hígado.

### 3.- ESTUDIO RENAL

#### A) TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA (microscopía óptica):

No se han observado lesiones morfológicas en ninguno de los grupos estudiados

#### B) ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO: NITROTIROSINA

En los animales sépticos se produce un incremento en el grado de tinción próximo a la significación estadística ( $p=0,06$ ). En este caso la Hb no parece incrementar el grado de tinción en el grupo control, ni tampoco ejerce ningún efecto en el grupo séptico.

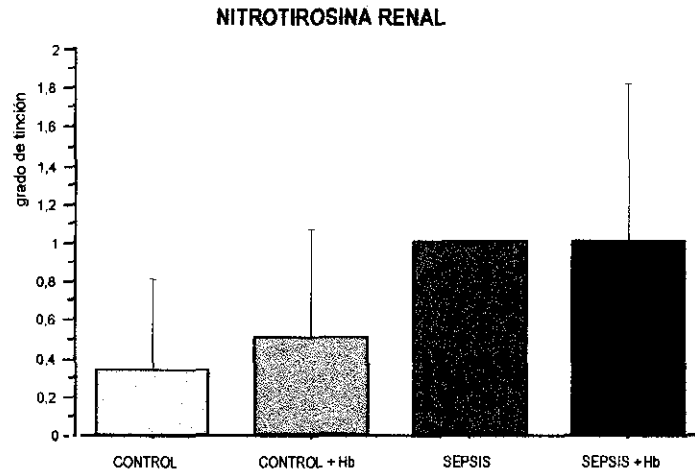


Fig R-69. Expresión tisular de nitrotirosina en riñón.

#### 4.- ESTUDIO PULMONAR

En el pulmón no se observan diferencias significativas en el grado de lesión tisular entre los diferentes grupos. El grado de lesión en todos ellos es pequeño.

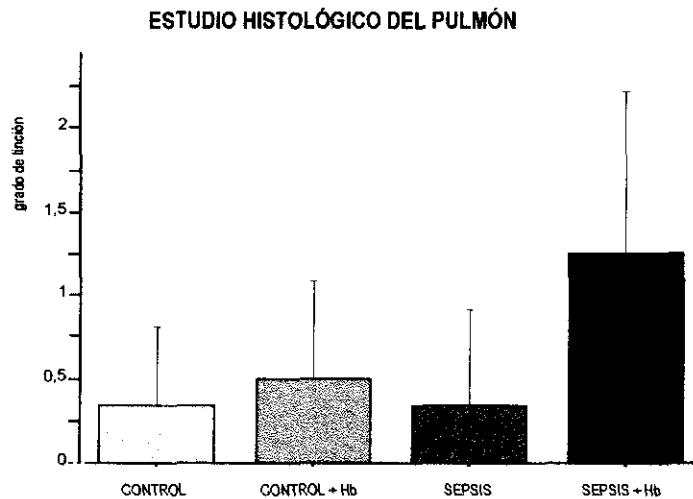


Fig 70. Estudio histológico pulmonar.

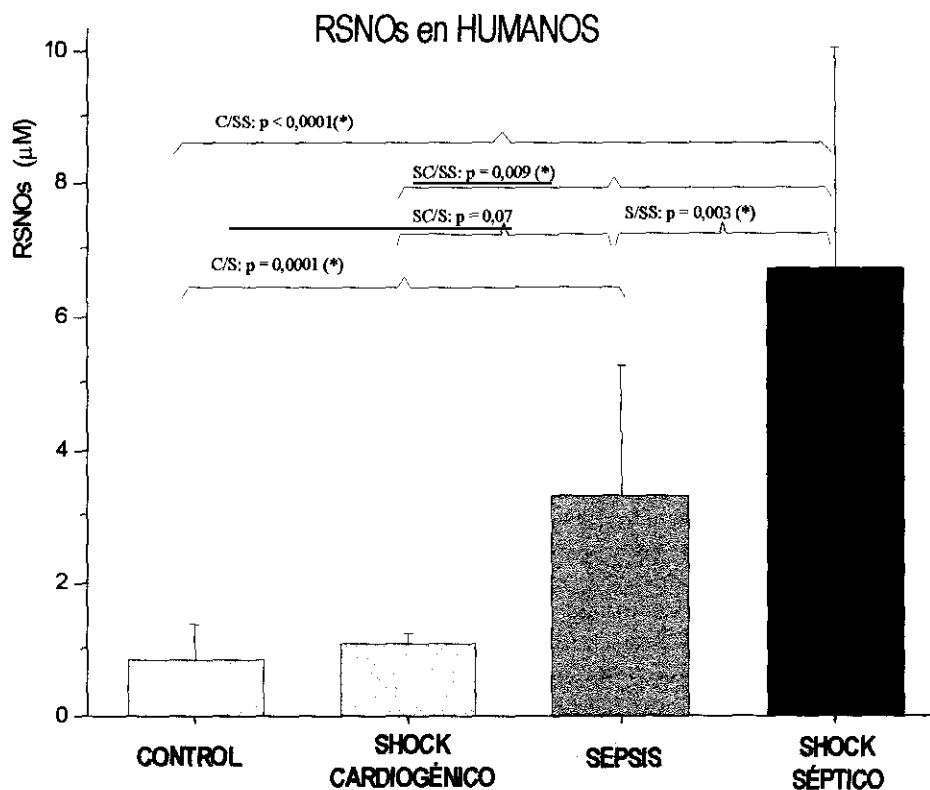
En cuanto a la nitrotirosina, en nuestro modelo no hemos hallado positividad en ninguno de los animales estudiados.

## SEPSIS HUMANA

Se ha medido la concentración sérica de RSNOs en humanos que padecían shock séptico, sepsis, shock cardiogénico y en individuos sanos como grupo control. Los criterios de inclusión para cada uno de los grupos se ha detallado previamente en el apartado de material y métodos.

### RSNOs

Existen diferencias significativas en los valores de RSNOs hallados en los diferentes grupos. Los grupos de personas que estaban afectadas por algún tipo de infección y además cumplían el resto de los criterios de sepsis tenían los niveles de RSNOs significativamente superiores al grupo control y al grupo de enfermos que padecían de shock cardiogénico. También se observan diferencias significativas entre los pacientes sépticos que no precisaban administración de drogas vasoactivas (sepsis) y aquellos que presentaban fracaso hemodinámico (necesidad de drogas vasoactivas: shock séptico).



**Fig R71** - Concentraciones de RSNOs en diferentes patologías humanas. C= control, S= sepsis, SC= shock cardiogénico, SS=shock séptico.

Por lo tanto, existe una relación directa entre los niveles de RSNOs y la presencia o no de infección. También se observa un incremento en su concentración en función del grado de afectación vascular de la sepsis.

## ANEXO

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En este apartado se van a mostrar todos los cálculos que se han efectuado para la obtención de resultados. Las tablas que muestran el análisis de la varianza obtenido, expresan los siguientes valores:

gl: grados de libertad.  
 SC: suma de cuadrados.  
 MC: media de cuadrados.  
 F: estadístico de contraste F.  
 p: significación estadística.

C: control.  
 S: sepsis.  
 C + Hb: control tratado con Hb.  
 S + Hb: sepsis tratada con Hb.

## 1.- EVOLUCIÓN HEMODINÁMICA DE LA SEPSIS

## A) Frecuencia Cardíaca

## Análisis de la Varianza: Evolución de la FC

	gl	SC	SC	F	p
sepsis	1	28,444	28,444	,018	0,8955
Error intragrupo	22	35447,889	1611,268		
Tiempo	5	2939,333	587,867	3,740	0,0036
Tiempo * sepsis	5	4696,222	939,244	5,976	<.0001
Error intragrupo	110	17289,111	157,174		

Valores Medios de FC  
(Control - Sepsis)

	N	Media	DS	ES
C, FC0	12	130,917	24,478	7,066
C, FC-30'	12	132,917	17,307	4,996
C, FC1	12	129,417	22,289	6,434
C, FC2	12	127,750	17,168	4,956
C, FC3	12	127,583	14,222	4,106
C, FC4	12	131,250	13,666	3,945
S, FC0	12	119,083	26,179	7,557
S, FC-30'	12	118,083	18,273	5,275
S, FC1	12	126,917	18,754	5,414
S, FC2	12	136,250	24,414	7,048
S, FC3	12	142,917	20,047	5,787
S, FC4	12	141,917	18,603	5,370

**Test de Bonferroni: Diferencia Sepsis - Control**

Hora 0: p = 0,2650  
 Hora 0,5: p = 0,0534  
 Hora 1: p = 0,7690  
 Hora 2: p = 0,3346  
 Hora 3: p = 0,0419 S  
 Hora 4: p = 0,1237

**B) Presión Arterial Media****Análisis de la Varianza : Evolución de la Presión Arterial Media**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	12750,174	12750,174	21,375	0,0001
Error intragrupo	22	13123,153	596,507		
Tiempo	5	6278,951	1255,790	8,398	<,0001
Tiempo * Sepsis	5	12499,618	2499,924	16,717	<,0001
Error intragrupo	110	16449,597	149,542		

**Valores Medios de Presión Arterial  
(Control - Sepsis)**

	N	Medias	DS	Err. Std.
C, hora 0	12	105,333	9,247	2,670
C, hora 0,5	12	104,500	7,026	2,028
C, hora 1	12	109,667	9,661	2,789
C, hora 2	12	112,583	6,868	1,983
C, hora 3	12	110,250	7,557	2,182
C, hora 4	12	111,917	8,328	2,404
S, hora 0	12	110,750	22,919	6,616
S, hora 0,5	12	108,083	29,553	8,531
S, hora 1	12	96,667	18,312	5,286
S, hora 2	12	81,333	14,834	4,282
S, hora 3	12	72,917	13,873	4,005
S, hora 4	12	71,583	11,836	3,417

**Test de Bonferroni: Diferencia Sepsis - Control**

Hora 0: p = 0,4558  
 Hora 0,5: p = 0,6868  
 Hora 1: p = 0,0407 S  
 Hora 2: p <0,0001 S  
 Hora 3: p <0,0001 S  
 Hora 4: p <0,0001 S

## C) Presión en Arteria Pulmonar

## Análisis de la Varianza: Evolución de la PAP

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	6466,840	6466,840	78,487	<.0001
Error intragrupo	22	1812,653	82,393		
Tiempo	5	1499,868	299,974	17,026	<.0001
Tiempo * Sepsis	5	1455,868	291,174	16,526	<.0001
Error intragrupo	110	1938,097	17,619		

Valores Medios de PAP  
(Control - Sepsis)

	N	Medias	DS	ES
C, hora 0	12	17,167	2,125	0,613
C, hora 0,5	12	17,000	2,923	0,844
C, hora 1	12	16,917	2,466	0,712
C, hora 2	12	17,833	2,887	0,833
C, hora 3	12	17,583	4,295	1,240
C, hora 4	12	18,250	4,003	1,156
S, hora 0	12	20,083	6,052	1,747
S, hora 0,5	12	41,417	12,450	3,594
S, hora 1	12	27,750	5,154	1,488
S, hora 2	12	30,417	5,334	1,540
S, hora 3	12	32,333	4,271	1,233
S, hora 4	12	33,167	3,762	1,086

## Test de Bonferroni: Diferencia Sepsis - Control

Hora 0: p = 0,1295  
 Hora 0,5: p <0,0001 S  
 Hora 1: p <0,0001 S  
 Hora 2: p <0,0001 S  
 Hora 3: p <0,0001 S  
 Hora 4: p <0,0001 S

## D) Índice Cardíaco (IC)

## Análisis de la Varianza: Evolución del IC

	DF	SC	MC	F	p
Sepsis	1	236,331	236,331	0,197	0,6619
Error intragrupo	22	26459,269	1202,694		
Tiempo	5	2479,695	495,939	2,982	0,0146
Tiempo * Sepsis	5	1037,561	207,512	1,248	,2919
Error intragrupo	110	18294,215	166,311		



**Valores Medios del IC  
(Control - Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
C, hora 0	12	73,476	3,601	1,040
C, h-0,5	12	70,561	4,833	1,395
C, hora 1	12	69,163	9,774	2,822
C, hora 2	12	68,237	8,883	2,564
C, hora 3	12	66,534	8,774	2,533
C, hora 4	12	65,088	7,615	2,198
S, hora 0	12	71,856	3,363	0,971
S, h-0,5	12	64,129	16,914	4,883
S, hora 1	12	66,517	22,467	6,486
S, hora 2	12	76,811	35,507	10,250
S, hora 3	12	60,038	27,874	8,046
S, hora 4	12	58,334	29,715	8,578

### E) Flujo Mesentérico

**Análisis de la Varianza: Evolución del Flujo Mesentérico**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	89,931	89,931	10,873	0,0033
Error	22	181,958	8,271		
Tiempo	5	85,926	17,185	13,051	<,0001
Tiempo * Sepsis	5	32,543	6,509	4,943	0,0004
Error intragrupo	110	144,846	1,317		

**Valores Medios de Flujo Mesentérico  
(Control - Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
C, hora 0	12	8,093	0,767	0,221
C, hora 0,5	12	8,477	1,771	0,511
C, hora 1	12	7,755	1,864	0,538
C, hora 2	12	7,546	1,956	0,565
C, hora 3	12	7,018	1,902	0,549
C, hora 4	12	6,774	1,903	0,549
S, hora 0	12	8,514	1,262	0,364
S, hora 0,5	12	6,028	1,394	0,402
S, hora 1	12	5,591	1,970	0,569
S, hora 2	12	5,403	1,264	0,365
S, hora 3	12	5,480	1,278	0,369
S, hora 4	12	5,163	0,894	0,258

**Test de Bonferroni: Diferencia Sepsis - Control**

Hora 0: p = 0,3334  
 Hora 0,5: p = 0,0011 S  
 Hora 1: p = 0,0113 S  
 Hora 2: p = 0,0043 S  
 Hora 3: p = 0,0297 S

Hora 4: p = 0,0145 S

**F) Flujo Portal****Análisis de la Varianza: Evolución del flujo Portal**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	608,789	608,789	11,109	0,0030
Error	22	1205,584	54,799		
Tiempo	5	488,536	97,707	47,616	<,0001
Tiempo * Sepsis	5	56,676	11,335	5,524	0,0001
Error intragrupo	110	225,719	2,052		

**Valores Medios de Flujo Portal  
(Control - Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
C, hora 0	12	17,553	2,567	0,741
C, hora 0,5	12	16,539	3,776	1,090
C, hora 1	12	15,312	3,786	1,093
C, hora 2	12	14,696	4,453	1,286
C, hora 3	12	14,415	4,662	1,346
C, hora 4	12	13,522	4,308	1,244
S, hora 0	12	16,129	2,038	0,588
S, hora 0,5	12	11,956	1,891	0,546
S, hora 1	12	11,051	3,169	0,915
S, hora 2	12	9,523	2,718	0,785
S, hora 3	12	9,386	2,185	0,631
S, hora 4	12	9,319	2,208	0,637

**G) Distribución de Flujo Mesentérico (% respecto al IC)****Análisis de la Varianza: % Flujo Mesentérico**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	7,690	7,690	0,113	0,7401
Error	22	1499,406	68,155		
Tiempo	5	34,475	6,895	1,083	0,3737
Tiempo * Sepsis	5	70,790	14,158	2,224	0,0569
Error intragrupo	110	700,188	6,365		

**Valores Medios de % Flujo Mesentérico  
(Control – Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
C, hora 0	12	11,049	1,300	0,375
C, hora 0,5	12	12,015	2,593	0,749
C, hora 1	12	11,362	2,720	0,785
C, hora 2	12	11,133	2,634	0,760
C, hora 3	12	10,674	2,850	0,823
C, hora 4	12	10,311	2,311	0,667
S, hora 0	12	11,923	2,101	0,606
S, hora 0,5	12	10,184	3,831	1,106
S, hora 1	12	10,451	6,857	1,979
S, hora 2	12	8,613	4,222	1,219
S, hora 3	12	10,991	5,475	1,581
S, hora 4	12	11,609	7,060	2,038

**H) Distribución de Flujo Portal (% respecto al IC)**

**Análisis de la Varianza: Evolución del % Flujo Portal**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	341,870	341,870	1,632	0,2148
Error	22	4609,367	209,517		
Tiempo	5	300,068	60,014	3,912	0,0027
Tiempo * Sepsis	5	133,449	26,690	1,740	0,1315
Error intragrupo	110	1687,497	15,341		

**Valores Medios de % Flujo Portal  
(Control – Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
C, hora 0	12	23,947	3,738	1,079
C, hora 0,5	12	23,477	5,198	1,501
C, hora 1	12	22,247	4,877	1,408
C, hora 2	12	21,731	6,489	1,873
C, hora 3	12	22,075	7,889	2,277
C, hora 4	12	20,776	6,294	1,817
S, hora 0	12	22,464	2,789	0,805
S, hora 0,5	12	19,705	4,850	1,400
S, hora 1	12	19,663	10,245	2,957
S, hora 2	12	15,051	7,534	2,175
S, hora 3	12	18,746	8,429	2,433
S, hora 4	12	20,134	9,982	2,881

**I) Resistencia Mesentérica****Análisis de la Varianza: Resistencia Mesentérica**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	9,956	9,956	,078	0,7831
Error	22	2820,817	128,219		
Tiempo	5	258,107	51,621	3,521	0,0054
Tiempo * Sepsis	5	485,430	97,086	6,622	<,0001
Error intragrupo	110	1612,666	14,661		

**Valores Medios de Resistencia Mesentérica  
(Control – Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
C, hora 0	12	13,115	1,655	0,478
C, hora 0,5	12	13,118	4,366	1,260
C, hora 1	12	15,376	6,332	1,828
C, hora 2	12	16,238	6,066	1,757
C, hora 3	12	17,212	6,426	1,855
C, hora 4	12	18,415	7,887	2,277
S, hora 0	12	13,167	2,663	0,769
S, hora 0,5	12	19,164	6,827	1,971
S, hora 1	12	19,672	8,046	2,323
S, hora 2	12	16,370	7,308	2,110
S, hora 3	12	13,964	4,051	1,169
S, hora 4	12	14,294	3,518	1,016

**I) Resistencia Vascular Sistémica****ANOVA para RVS**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	0,487	0,487	0,586	0,4520
Error intragrupo	22	18,268	0,830		
Tiempo	5	1,041	0,208	1,075	0,3780
Tiempo * Sepsis	5	2,840	0,568	2,933	0,0159
Error intragrupo	110	21,306	0,194		

**Valores Medios de RVS  
(Control – Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
C, hora 0	12	1,369	0,165	0,048
C, hora 0,5	12	1,406	0,169	0,049
C, hora 1	12	1,544	0,336	0,097
C, hora 2	12	1,605	0,294	0,085
C, hora 3	12	1,604	0,272	0,079
C, hora 4	12	1,673	0,288	0,083
S, hora 0	12	1,456	0,348	0,100
S, hora 0,5	12	1,646	0,616	0,178
S, hora 1	12	1,686	1,373	0,396
S, hora 2	12	1,108	0,459	0,132
S, hora 3	12	1,260	0,454	0,131
S, hora 4	12	1,350	0,618	0,178

## 2. CAMBIOS BIOQUÍMICOS EN LA SEPSIS

### ANOVA para la variación de la trigliceridemia

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	5,556	5,556	0,086	0,7723
Error intragrupo	22	1423,944	64,725		
Tiempo	2	1388,083	694,042	10,561	,0002
Tiempo * Sepsis	2	1054,361	527,181	8,022	,0011
Error intragrupo	44	2891,556	65,717		

### Valores medios de Trigliceridemia (Control - Sepsis)

	N	Media	DS	Err. Std.
CONTROL, hora 0	12	26,667	7,303	2,108
CONTROL, hora 1	12	25,917	4,316	1,246
CONTROL, hora 4	12	27,500	12,681	3,661
SEPSIS, hora 0	12	20,167	5,890	1,700
SEPSIS, hora 1	12	20,500	7,255	2,094
SEPSIS, hora 4	12	37,750	8,497	2,453

### ANOVA para Fosfatemia

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	3,075	3,075	3,360	0,0604
Error intragrupo	22	20,133	,915		
Tiempo	2	21,947	10,973	140,153	<,0001
Tiempo * Sepsis	2	16,146	8,073	103,111	<,0001
Error intragrupo	44	3,445	,078		

### Valores medios de fosfatemia (Control - Sepsis)

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora-0	12	5,932	0,645	0,186
CONTROL, hora-1	12	6,028	0,682	0,197
CONTROL, hora-4	12	6,126	0,565	0,163
SEPSIS, hora-0	12	5,272	0,573	0,166
SEPSIS, hora-1	12	6,285	0,695	0,201
SEPSIS, hora-4	12	7,769	0,362	0,104

**ANOVA para Calcio**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	0,210	0,210	0,287	0,5977
Error intragrupo	22	16,127	0,733		
Tiempo	2	4,577	2,288	5,667	0,0065
Tiempo * Sepsis	2	1,184	0,592	1,466	0,2419
Error intragrupo	44	17,768	0,404		

**Valores medios de Calcio  
(Control – Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora 0	12	8,925	0,450	0,130
CONTROL, hora 1	12	8,725	0,544	0,157
CONTROL, hora 4	12	8,041	0,376	0,108
SEPSIS, hora 0	12	8,754	1,169	0,337
SEPSIS, hora 1	12	8,772	0,820	0,237
SEPSIS, hora 4	12	8,489	0,635	0,183

**ANOVA para creatinina**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	2,920E-4	2,920E-4	0,015	0,9024
Error intragrupo	22	0,417	0,019		
Tiempo	2	0,003	0,002	1,078	0,3492
Tiempo * Sepsis	2	0,016	0,008	5,192	0,0095
Error intragrupo	44	0,068	0,002		

**Valores medios de creatinina  
(Sepsis – Control)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora 0	12	0,681	0,085	0,025
CONTROL, hora 1	12	0,653	0,078	0,023
CONTROL, hora 4	12	0,658	0,098	0,028
SEPSIS, hora 0	12	0,637	0,086	0,025
SEPSIS, hora 1	12	0,658	0,075	0,022
SEPSIS, hora 4	12	0,685	0,090	0,026

**ANOVA para urea**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	2,347	2,347	0,199	0,6602
Error intragrupo	22	259,972	11,817		
Tiempo	2	7,694	3,847	1,985	0,1495
Tiempo * Sepsis	2	10,361	5,181	2,673	0,0802
Error intragrupo	44	85,278	1,938		

**Valores medios de uremia  
(Sepsis – Control)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora 0	12	17,000	2,132	0,615
CONTROL, hora 1	12	16,667	1,614	0,466
CONTROL, hora 4	12	15,500	1,732	0,500
SEPSIS, hora	12	17,000	2,763	0,798
SEPSIS, hora 1	12	16,333	1,923	0,555
SEPSIS, hora 4	12	16,917	3,147	0,908

**ANOVA para glucemia**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	5547,556	5547,556	3,712	0,0670
Error intragrupo	22	32881,944	1494,634		
Tiempo	2	60,333	30,167	0,046	0,9547
Tiempo * Sepsis	2	2060,444	1030,222	1,583	0,2167
Error intragrupo	44	28627,222	650,619		

**Valores medios de glucemia  
(Sepsis – Control)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora 0	12	112,167	27,065	7,813
CONTROL, hora 1	12	116,667	43,263	12,489
CONTROL, hora 4	12	102,750	23,195	6,696
SEPSIS, hora 0	12	89,500	28,937	8,353
SEPSIS, hora 1	12	89,333	24,265	7,005
SEPSIS, hora 4	12	100,083	31,990	9,235

**ANOVA para fosfatasa alcalina**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	72771,125	72771,125	21,470	0,0001
Error intragrupo	22	74567,528	3389,433		
Tiempo	2	49798,028	24899,014	46,293	<,0001
Tiempo * Sepsis	2	42429,083	21214,542	39,443	<,0001
Error intragrupo	44	23665,556	537,854		

**Valores medios de Fosfatasa Alcalina  
(Control - Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora-0	12	207,583	35,026	10,111
CONTROL, hora-1	12	204,500	36,027	10,400
CONTROL, hora-4	12	210,750	39,185	11,312
SEPSIS, hora-0	12	227,250	49,437	14,271
SEPSIS, hora-1	12	244,333	45,243	13,061
SEPSIS, hora-4	12	342,000	19,470	5,621

**ANOVA para Albúmina**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	1,044	1,044	1,565	0,2241
Error intragrupo	22	14,680	0,667		
Tiempo	2	1,435	0,718	37,482	<,0001
Albúmina * sepsis	2	1,750E-4	8,750E-5	,005	0,9954
Error intragrupo	44	0,843	0,019		

**Valores medios de Albúmina  
(Control - Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora-0	12	1,591	0,522	0,151
CONTROL, hora-1	12	1,423	0,447	0,129
CONTROL, hora-4	12	1,242	0,386	0,112
SEPSIS, hora-0	12	1,349	0,641	0,185
SEPSIS, hora-1	12	1,178	0,483	0,140
SEPSIS, hora-4	12	1,006	0,382	0,110

**ANOVA para PT**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	7,796	7,796	6,552	0,0187
Error intragrupo	20	23,806	1,190		
Tiempo	2	6,668	3,334	27,867	<,0001
Tiempo * Sepsis	2	,161	0,081	0,674	0,5155
Error intragrupo	40	4,786	0,120		



**Valores medios de proteínas totales séricas  
(Sepsis - Control)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora-0	12	3,994	1,051	0,303
CONTROL, hora-1	12	3,604	0,823	0,237
CONTROL, hora-4	12	3,167	0,504	0,145
SEPSIS, hora-bas	10	3,180	0,524	0,166
SEPSIS, hora-1	10	3,033	0,596	0,188
SEPSIS, hora-4	10	2,481	0,247	0,078

**ANOVA para BT**

	DF	SC	MC	F	p
Sepsis	1	0,001	0,001	0,072	0,7916
Error intragrupo	22	0,246	0,011		
Tiempo	2	0,103	0,052	13,562	<.0001
Tiempo * Sepsis	2	0,022	0,011	2,895	0,0659
Error intragrupo	44	0,167	0,004		

**Valores medios de Bilirrubina  
(Control - Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora-0	12	,243	0,066	0,019
CONTROL, hora-1	12	,263	0,085	0,024
CONTROL, hora-4	12	,293	0,113	0,033
SEPSIS, hora-0	12	,203	0,033	0,010
SEPSIS, hora-1	12	,242	0,069	0,020
SEPSIS, hora-4	12	,335	0,085	0,025

**ANOVA para BD**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	0,005	0,005	0,683	0,4173
Error intragrupo	22	0,147	0,007		
Tiempo	2	0,019	0,010	6,639	0,0030
Tiempo * Sepsis	2	0,016	0,008	5,618	0,0067
Error intragrupo	44	0,063	0,001		

**Valores medios de BD  
(Control - Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora-0	12	0,131	0,046	0,013
CONTROL, hora-1	12	0,142	0,052	0,015
CONTROL, hora-4	12	0,138	0,032	0,009
SEPSIS, hora-0	12	0,124	0,048	0,014
SEPSIS, hora-1	12	0,138	0,051	0,015
SEPSIS, hora-4	12	0,196	0,091	0,026

**ANOVA para pH**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	0,240	0,240	17,222	0,0004
Error intragrupo	22	0,307	0,014		
Tiempo	3	0,375	0,125	36,294	<,0001
Tiempo * Sepsis	3	00,12	00,04	12,530	<,0001
Error intragrupo	66	0,227	0,003		

**Valores medios de pH  
(Control - sepsis)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora 0	12	7,407	0,050	0,014
CONTROL, hora 1	12	7,388	0,052	0,015
CONTROL, hora 3	12	7,365	0,078	0,023
CONTROL, hora 4	12	7,337	0,076	0,022
SEPSIS, hora 0	12	7,409	0,022	0,006
SEPSIS, hora 1	12	7,299	0,060	0,017
SEPSIS, hora 3	12	7,256	0,111	0,032
SEPSIS, hora 4	12	7,133	0,123	0,035

**Indicador bioquímico de hipoperfusión de la mucosa intestinal: pCO<sub>2i</sub> - pCO<sub>2a</sub>**

**1. Segmento del yeyuno proximal**

**ANOVA para pCO<sub>2iP</sub> - pCO<sub>2a</sub>**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	1412,200	1412,200	14,056	,0011
Error intragrupo	22	2210,308	100,469		
Tiempo	3	6290,506	2096,835	129,671	<,0001
Tiempo * sepsis	3	3116,314	1038,771	64,239	<,0001
Error intragrupo	66	1067,245	16,170		

**Tabla de medias de pCO<sub>2</sub>p – pCO<sub>2</sub>a  
(Sepsis – Control)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora 0	12	10,483	5,964	1,722
CONTROL, hora 1	12	12,042	5,555	1,604
CONTROL, hora 3	12	10,317	6,634	1,915
CONTROL, hora 4	12	16,550	6,781	1,958
SEPSIS, hora 0	12	10,033	3,767	1,087
SEPSIS, hora 1	12	11,992	5,224	1,508
SEPSIS, hora 3	12	14,325	6,635	1,915
SEPSIS, hora 4	12	43,725	7,486	2,161

## 2. Segmento del ileon distal

**ANOVA para pCO<sub>2</sub>ID – pCO<sub>2</sub>a**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	6567,042	6567,042	17,007	0,0004
Error intragrupo	22	8495,073	386,140		
Tiempo	3	10297,628	3432,543	39,454	<0,0001
Tiempo * Sepsis	3	9205,471	3068,490	35,269	<0,0001
Error intragrupo	66	5742,107	87,002		

**Tabla de medias de pCO<sub>2</sub> D – pCO<sub>2</sub>a  
(Control – sepsis)**

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
CONTROL, hora 0	12	18,883	11,771	3,398
CONTROL, hora 1	12	10,008	11,842	3,419
CONTROL, hora 3	12	12,567	14,942	4,314
CONTROL, hora 4	12	19,008	16,295	4,704
SEPSIS, hora 0	12	14,633	5,936	1,714
SEPSIS, hora 1	12	12,700	9,132	2,636
SEPSIS, hora 3	12	31,808	15,563	4,493
SEPSIS, hora 4	12	62,383	24,282	7,010

### Comparación de los efectos de la sepsis en ambos segmentos:

- Existe diferencia significativa al comienzo del experimento dependiendo del segmento intestinal considerado

**ANOVA diferencia entre los dos segmento en la hora cero**

	gl	SC	MC	F	p
Segmento	1	507,000	507,000	9,080	0,0042
Residual	46	2568,637	55,840		

- Existe diferencia en el segmento intestinal a considerar (proximal y distal) dentro de los animales sépticos.Hora3

## ANOVA para la diferencia entre los dos segmenteos en la hora 3

	gl	SC	MC	F	p
Segmento	1	1834,002	1834,002	12,815	0,0017
Residual	22	3148,472	143,112		

- Existe diferencia en el segmento intestinal a considerar (proximal y distal) dentro de los animales sépticos.Hora4

## ANOVA para la diferencia entre los dos segmentos en la hora cuatro

	gl	SC	MC	F	p
Segmento	1	2088,800	2088,800	6,470	0,0185
Residual	22	7102,279	322,831		

- Valor la variación que sufre el  $pCO_{2i}$ - $pCO_{2a}$  entre la hora 0 y la hora 4, para cada uno de los segmento en animales sépticos.

## ANOVA varación que existe entre la hora 0 y 4 en función del segmento

	gl	SC	MC	F	p
Segmento	1	1185,820	1185,820	4,058	0,0563
Residual	22	6428,279	292,195		

## ANOVA para lactatemia

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	15,248	15,248	24,636	<,0001
Error intragrupa	22	13,616	,619		
Tiempo	3	22,036	7,345	33,465	<,0001
Tiempo * Sepsis	3	24,476	8,159	37,171	<,0001
Error intragrupa	66	14,486	,219		

ANOVA para K<sup>+</sup>

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	0,221	0,221	1,007	0,3275
Error intragrupo	20	4,379	0,219		
Tiempo	2	3,668	1,834	20,909	<,0001
Tiempo * Sepsis	2	1,651	0,825	9,412	0,0004
Error intragrupo	40	3,508	0,088		

Means Table for k  
Effect: Category for k \* Column 2

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora 0	12	3,017	,217	,063
CONTROL, hora 1	12	3,008	,144	,042
CONTROL, hora 4	12	3,217	,310	,089
SEPSIS, hora 0	12	2,780	,253	,080
SEPSIS, hora 1	12	3,060	,350	,111
SEPSIS, hora 4	12	3,750	,700	,221

ANOVA para la variación del Cl<sup>-</sup>

	DF	SC	MC	F	p
Sepsis	1	28,608	28,608	0,265	0,6127
Error intragrupo	20	2162,922	108,146		
Tiempo	2	1041,909	520,955	16,955	<,0001
Tiempo * Sepsis	2	592,413	296,207	9,640	0,0004
Error intragrupo	40	1229,011	30,725		

Valores medios de Cl<sup>-</sup>  
(Control - Sepsis)

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora 0	12	110,417	7,465	2,155
CONTROL, hora 1	12	113,250	4,731	1,366
CONTROL, hora 4	12	113,667	2,708	0,782
SEPSIS, hora 0	10	105,700	9,945	3,145
SEPSIS, hora 1	10	112,400	11,286	3,569
SEPSIS, hora 4	10	123,200	6,795	2,149

ANOVA para la variación de Na<sup>+</sup>

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	205,578	205,578	4,491	0,0468
Error intragrupo	20	915,589	45,779		
Tiempo	2	139,909	69,955	4,382	0,0190
Tiempo * sepsis	2	138,880	69,440	4,350	0,0195
Error intragrupo	40	638,544	15,964		

**ANOVA para AST**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	102,722	102,722	1,061	0,3142
Error intragrupo	22	2129,944	96,816		
Tiempo	2	1843,000	921,500	27,584	<,0001
Tiempo * Sepsis	2	2040,444	1020,222	30,540	<,0001
Error intragrupo	44	1469,889	33,407		

**Valores medios de AST****(Control – Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora -0	12	30,917	7,192	2,076
CONTROL, hora-1	12	26,667	6,243	1,802
CONTROL, hora-4	12	28,333	5,867	1,694
SEPSIS, hora-0	12	23,417	4,757	1,373
SEPSIS, hora-1	12	24,167	5,557	1,604
SEPSIS, hora-4	12	45,500	12,192	3,519

**ANOVA para ALT**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	46,722	46,722	,387	0,5402
Error intragrupo	22	2654,556	120,662		
Tiempo	2	92,528	46,264	6,195	0,0043
Tiempo * Sepsis	2	3,528	1,764	0,236	0,7906
Error intragrupo	44	328,611	7,468		

**Valores medios de ALT****(Control – Sepsis)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora 0	12	19,917	7,728	2,231
CONTROL, hora 1	12	17,667	6,583	1,900
CONTROL, hora 4	12	16,917	6,459	1,865
SEPSIS, hora 0	12	21,000	7,909	2,283
SEPSIS, hora 1	12	19,833	5,524	1,595
SEPSIS, hora 4	12	18,500	5,776	1,667

ANOVA para  $\gamma$ -gt

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	30,681	30,681	1,203	0,2847
Error intragrupo	22	561,306	25,514		
tiempo	2	289,778	144,889	14,753	<.0001
Tiempo * Sepsis	2	183,444	91,722	9,340	0,0004
Error intragrupo	44	432,111	9,821		

## Valores medios de ALT

(Control - sepsis)

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora 0	12	15,000	1,414	0,408
CONTROL, hora 1	12	14,750	2,598	0,750
CONTROL, hora 4	12	15,833	3,786	1,093
SEPSIS, hora 0	12	12,917	1,165	0,336
SEPSIS, hora 1	12	15,167	3,614	1,043
SEPSIS, hora 4	12	21,417	7,267	2,098

## ANOVA para LDH

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	166176,125	166176,125	0,512	0,4820
Error intragrupo	22	7147318,861	324878,130		
Tiempo	2	230356,694	115178,347	4,840	0,0126
Tiempo * Sepsis	2	244530,750	122265,375	5,138	0,0099
Error intragrupo	44	1047114,556	23798,058		

## Tabla de medias de LDH

(Sepsis-Control)

	N	Media	SD	ES
CONTROL, hora 0	12	868,583	413,209	119,283
CONTROL, hora 1	12	815,333	390,609	112,759
CONTROL, hora 4	12	836,917	431,756	124,637
SEPSIS, hora 0	12	668,500	183,623	53,007
SEPSIS, hora 1	12	660,500	177,951	51,370
SEPSIS, hora 4	12	903,583	412,110	118,966

**Análisis de la Varianza para leucocitemia**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	369,467	369,467	10,471	0,0038
Error intragrupo	22	776,260	35,285		
Tiempo	2	166,394	83,197	9,098	0,0005
Tiempo * Sepsis	2	349,447	174,723	19,106	<0,0001
Error intragrupo	44	402,373	9,145		

**ANOVA para RSNO**

	gl	SC	MC	F	P
sepsis	1	42,473	42,473	25,276	<,0001
Error intragrupo	22	36,969	1,680		
Tiempo	2	40,977	20,488	22,466	<,0001
Tiempo * sepsis	2	50,997	25,499	27,959	<,0001
Error intragrupo	44	40,128	0,912		

**Valores medios de RSNOs****(Control – sepsis)**

	N	Media	DS	ES
CONTROL, hora 0	12	1,158	0,740	0,214
CONTROL, hora 1	12	,960	0,438	0,126
CONTROL, hora 4	12	,875	0,357	0,103
SEPSIS, hora 0	12	1,338	0,577	0,167
SEPSIS, hora 1	12	1,471	0,714	,206
SEPSIS, hora 4	12	4,783	2,302	0,664

**ANOVA para nitratos y nitritos**

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	3535,938	3535,938	3,575	0,0703
Error intragrupo	25	24728,638	989,146		
Tiempo	2	159,383	79,692	0,860	0,4293
Tiempo * Sepsis	2	376,404	188,202	2,031	0,1419
Error intragrupo	50	4632,812	92,656		



### 3. EFECTOS HEMODINÁMICOS DE LA Hb

#### A) EFECTOS SOBRE LA FRECUENCIA CARDIACA

##### Análisis de la varianza: efecto de la Hb sobre la FC

	gl	SC	MC	F	p
Tiempo	1	88,021	88,021	0,365	0,5527
Tiempo * Sepsis	1	58,521	58,521	0,242	0,6278
Tiempo * hb	1	697,688	697,688	2,890	0,1046
Tiempo * Sepsis * hb	1	105,021	105,021	0,435	0,5171
Error intragrupo	20	4828,250	241,412		

##### Valores Medios de Frecuencia Cardíaca ( Sepsis - Control / hb - Sin Hb)

	M	Media	SD	ES
C,Sin Hb, previo	6	134,667	7,285	2,974
C,Sin Hb, 45'	6	138,833	7,679	3,135
C,Hb, previo	6	127,833	18,159	7,414
C,Hb, 45'	6	122,667	36,681	14,975
S,Sin Hb,previo	6	139,333	11,535	4,709
S,Sin Hb, 45'	6	145,000	21,373	8,725
S,Hb, previo	6	144,500	24,745	10,102
S,Hb, 45'	6	129,000	37,433	15,282

#### B) EFECTO SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL

##### Análisis de la Varianza: Efecto de la Hb sobre la PA

	gl	SC	MC	F	p
Tiempo	1	963,021	963,021	21,284	0,0002
Tiempo * Sepsis	1	130,021	130,021	2,874	,1056
Tiempo * hb	1	2422,521	2422,521	53,541	<0,0001
Tiempo * Sepsis * hb	1	1463,021	1463,021	32,335	<0,0001
Error intragrupo	20	904,917	45,246		

**Valores medios de PAM  
(Control-sepsis / Sin Hb-Hb)**

	N	Media	DS	ES
C,Sin Hb, previo	6	105,833	5,456	2,227
C,Sin Hb, 45'	6	108,333	2,338	955
C,Hb, previo	6	118,000	5,831	2,380
C,Hb, 45'	6	126,833	13,288	5,425
S,Sin Hb, previo	6	67,333	8,311	3,393
S,Sin Hb, 45'	6	54,333	21,988	8,977
S,Hb, previo	6	75,833	13,992	5,712
S,Hb, 45'	6	113,333	17,671	7,214

**C) EFECTO SOBRE LA PRESIÓN DE LA ARTERIA PULMONAR**

**Análisis de la Varianza: Efecto de la Hb sobre la PAP**

	gl	SC	MC	F	p
Tiempo	1	850,083	850,083	47,780	<0,0001
Tiempo * Sepsis	1	18,750	18,750	1,054	0,3169
Tiempo * hb	1	588,000	588,000	33,049	<0,0001
Tiempo * Sepsis * hb	1	33,333	33,333	1,874	0,1862
Error intragrupo	20	355,833	17,792		

**Valores Medios de PAP  
(Control - Sepsis / Sin Hb - Hb)**

	N	Media	DS	ES
C,Sin Hb, previo	6	19,833	4,834	1,973
C,Sin Hb, 45'	6	18,333	2,251	0,919
C,Hb, previo	6	16,667	2,422	0,989
C,Hb, 45'	6	32,500	7,204	2,941
S,Sin Hb, previo	6	36,000	1,789	0,730
S,Sin Hb, 45'	6	40,333	8,687	3,547
S,Hb, previo	6	30,333	2,944	1,202
S,Hb, 45'	6	45,333	2,658	1,085

## D) EFECTO SOBRE EL ÍNDICE CARDIACO

## Análisis de la Varianza: Efecto de la Hb sobre el IC

	gl	SC	MC	F	p
Tiempo	1	2204,413	2204,413	28,258	<0,0001
Tiempo * Sepsis	1	1,581	1,581	0,020	0,8882
Tiempo * Hb	1	2000,911	2000,911	25,649	<0,0001
Tiempo * Sepsis * Hb	1	,395	,395	0,005	0,9440
Error intragrupo	20	1560,229	78,011		

Valores Medios de Índice  
(Control – Sepsis / Sin Hb – Hb)

	N	Media	DS	ES
C, Sin Hb, previo	6	67,084	7,233	2,953
C, Sin Hb, 45'	6	66,988	8,601	3,511
C, Hb, previo	6	63,091	8,105	3,309
C, Hb, 45'	6	36,806	9,072	3,704
S, Sin Hb, previo	6	54,278	23,544	9,612
S, Sin Hb, 45'	6	53,093	23,905	9,759
S, Hb, previo	6	62,391	36,725	14,993
S, Hb, 45'	6	35,743	19,637	8,017

## E) EFECTO SOBRE EL FLUJO MESENTÉRICO

## Análisis de la Varianza: Efecto sobre el flujo Mesentérico

	gl	SC	MC	F	p
Tiempo	1	27,016	27,016	54,448	<0,0001
Tiempo * Sepsis	1	1,664	1,664	3,355	0,0820
Tiempo * Hb	1	17,429	17,429	35,127	<0,0001
Tiempo * Sepsis * Hb	1	0,274	0,274	0,553	0,4657
Error intragrupo	20	9,924	0,496		

Valores Medios de Flujo Mesentérico  
(Control – Sepsis / Sin Hb – Hb)

	N	Media	DS	ES
C, Sin Hb, previo	6	7,429	1,428	0,583
C, Sin Hb, 45'	6	6,913	1,386	0,566
C, Hb, previo	6	6,118	2,212	0,903
C, Hb, 45'	6	2,889	1,586	0,648
S, Sin Hb, previo	6	4,928	1,176	0,480
S, Sin Hb, 45'	6	4,854	1,113	0,454
S, Hb, previo	6	5,399	0,493	0,201
S, Hb, 45'	6	3,217	0,492	0,201

**F) EFECTO SOBRE EL FLUJO PORTAL****Análisis de la Varianza: Efecto sobre el flujo Portal**

	gl	SC	MC	F	p
Tiempo	1	76,691	76,691	21,428	0,0002
Tiempo * Sepsis	1	2,398	2,398	0,670	0,4227
Tiempo * Hb	1	39,613	39,613	11,068	0,0034
Tiempo * Sepsis * Hb	1	,837	0,837	0,234	0,6339
Error intragrupo	20	71,582	3,579		

**Valores Medios de Flujo Portal  
(Control - Sepsis / Sin Hb - Hb)**

	N	Media	DS	ES
C,Sin Hb, previo	6	14,652	4,024	1,643
C,Sin Hb, 45'	6	13,230	3,064	1,251
C, Hb, previo	6	12,392	4,645	1,896
C, Hb, 45'	6	7,864	3,706	1,513
S,Sin Hb, previo	6	8,322	0,665	0,27
S, Sin Hb, 45'	6	8,322	0,665	0,27
S, Hb, previo	6	10,317	2,810	1,147
S, Hb, 45'	6	6,155	3,113	1,271

**G) EFECTO SOBRE LA VARIACIÓN DE DISTRIBUCIÓN DE FLUJO MESENTÉRICO****Análisis de la Varianza: ratio de flujo mesentérico**

	gl	SC	MC	F	p
Tiempo	1	3,562	3,562	1,299	0,2678
Tiempo * Sepsis	1	4,590	4,590	1,674	0,2105
Tiempo * Hb	1	2,137	2,137	0,779	0,3878
Tiempo * Sepsis * Hb	1	0,002	0,002	0,001	0,9765
Error intragrupo	20	54,830	2,742		

**Valores Medios del % de Flujo Mesentérico  
(Control – Sepsis / Sin Hb – Hb)**

	N	Media	DS	ES
C, Sin Hb, prev	6	11,064	1,815	0,741
C, Sin Hb, 45'	6	10,337	1,714	0,700
C, Hb, prev	6	9,558	2,663	1,087
C, Hb, 45'	6	7,959	3,850	1,572
S, Sin Hb, prev	6	10,958	6,414	2,619
S, Sin Hb, 45'	6	11,439	7,280	2,972
S, Hb, prev	6	12,260	8,216	3,354
S, Hb, 45'	6	11,926	6,753	2,757

**H) EFECTO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE FLUJO PORTAL**

**Análisis de la Varianza: Variación del % de Flujo Portal**

	gl	SC	MC	F	p
Tiempo	1	8,658	8,658	0,652	0,4290
Tiempo * Sepsis	1	13,466	13,466	1,014	0,3261
Tiempo * Hb	1	24,403	24,403	1,837	0,1904
Tiempo * Sepsis * Hb	1	2,423	2,423	0,182	0,6739
Error intragrupo	20	265,694	13,285		

**Valores medios de %Qp  
(control-sepsis / Sin Hb – Hb)**

	N	Media	DS	ES
C, Sin Hb, prev	6	21,845	5,963	2,435
C, Sin Hb, 45'	6	19,760	3,871	1,580
C, Hb, previo	6	19,706	6,988	2,853
C, Hb, 45'	6	21,372	7,641	3,119
S, Sin Hb, prev	6	18,725	10,123	4,133
S, Sin Hb, 45'	6	19,657	11,401	4,654
S, Hb, previo	6	21,543	10,581	4,320
C, Hb, 45'	6	24,428	17,806	7,269

## I) EFECTO SOBRE LA RESISTENCIA VASCULAR SISTEMICA

## ANOVA para la RVS

	gl	SC	MC	F	p
Tiempo	1	10,622	10,622	23,056	0,0001
Tiempo * sepsis	1	0,140	0,140	0,303	0,5879
Tiempo * hb	1	14,867	14,867	32,268	<0,0001
Tiempo * sepsis * Hb	1	1,250	1,250	2,712	0,1152
Error intragrupo	20	9,215	0,461		

## Valores medios de RVS

(Control – sepsis / Sin Hb – Hb)

	N	Media	DS	ES
C, Sin Hb, prev	6	1,525	0,152	0,062
C, Sin Hb, 45'	6	1,567	0,185	0,075
C, Hb, previo	6	1,821	0,326	0,133
C, Hb, 45'	6	3,444	1,133	0,462
S, Sin Hb, prev	6	1,278	0,436	0,178
S, Sin Hb, 45'	6	891	0,240	0,098
S, Hb, previo	6	1,421	0,799	0,326
S, Hb, 45'	6	3,906	2,361	0,964

## J) EFECTO SOBRE LA RESISTENCIA MESENTÉRICA

## ANOVA para Resistencia Mesentérica

	gl	SC	MC	F	p
Tiempo	1	2677,771	2677,771	9,936	0,0050
Tiempo * sepsis	1	349,338	349,338	1,296	0,2684
Tiempo * hb	1	2809,771	2809,771	10,425	0,0042
Tiempo * sepsis * hb	1	154,932	154,932	0,575	0,4572
Error intragrupo	20	5390,270	269,513		

#### 4. EFECTO DOSIS-RESPUESTA DE LA HEMOGLOBINA

##### 1.- ACCIÓN SOBRE LA FRECUENCIA CARDIACA

##### A) Efectos globales

ANOVA: efecto sobre la FC

	gl	SC	MC	F	p
Tiempo	1	3434,083	3434,083	0,968	0,3508
Error intragrupo	10	35857,167	3585,717		
Tiempo	3	4548,917	1516,306	9,123	0,0002
Tiempo * sepsis	3	1034,917	344,972	2,076	0,1245
Error intragrupo	30	4986,167	166,206		

##### Valores medios de Frecuencia Cardiaca Efecto dosis-respuesta de la Hb ( sepsis – control )

	N	Media	DS.	ES
C, dosis 0	6	127,833	18,159	7,414
C, dosis 100	6	94,167	33,469	13,664
C, dosis 200	6	111,000	36,546	14,920
C, dosis 400	6	122,667	36,681	14,975
S, dosis 0	6	144,500	24,745	10,102
S, dosis 100	6	125,833	33,060	13,497
S, dosis 200	6	124,000	30,516	12,458
S, dosis 400	6	129,000	37,433	15,282

##### B) Efectos sobre el grupo Control:

ANOVA efecto de la Hb sobre la FC en el grupo control

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	16952,333	3390,467		
Hemoglobina	3	4012,833	1337,611	5,419	0,0100
Error intragrupo	15	3702,667	246,844		

t de Student para datos pareados:

- FC basal – FC dosis 100:  $p=0,0132$
- FC dosis 100 – dosis 200:  $p = 0,056$
- FC dosis 200 – dosis 400:  $p = 0,0273$
- FC basal – dosis 200:  $p = 0,177$
- FC basal – dosis 400:  $p= 0,677$

##### C) Efectos sobre el grupo Séptico:

ANOVA efecto de la Hb sobre la FC en el grupo séptico

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	18904,833	3780,967		
Hemoglobina	3	1571,000	523,667	6,120	0,0063
Error intragrupo	15	1283,500	85,567		

t de Student para datos pareados:

- FC basal – FC dosis 100:  $p=0,0056$
- FC dosis 100 – dosis 200:  $p = 0,7494$
- FC dosis 200 – dosis 400:  $p = 0,3487$
- FC basal – dosis 200:  $p = 0,107$
- FC basal – dosis 400:  $p= 0,0549$

## 2.- PRESIÓN ARTERIAL MEDIA

### A) Efectos globales

**ANOVA: efecto de la Hb sobre la PAM**

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	9240,750	9240,750	15,214	0,0030
Error intragrupo	10	6073,750	607,375		
Hb	3	3616,167	1205,389	30,734	<0,0001
Hb * sepsis	3	1286,750	428,917	10,936	<0,0001
Error intragrupo	30	1176,583	39,219		

**Test de Bonferroni: diferencia SEPSIS-CONTROL**

- basal:  $p<0,0001$
- dosis 100:  $p = 0,0024$
- dosis 200:  $p = 0,0115$
- dosis 400:  $p = 0,1656$

**Valores medios de Presión Arterial Media  
Efecto dosis-respuesta de la Hb (control – sepsis)**

	N	Media	DS	ES
C, dosis 0	6	118,000	5,831	2,380
C, dosis 100	6	126,833	14,261	5,822
C, dosis 200	6	127,833	14,634	5,974
C, dosis 400	6	126,833	13,288	5,425
S, dosis 0	6	75,833	13,992	5,712
S, dosis 100	6	96,167	12,057	4,922
S, dosis 200	6	103,167	12,983	5,300
S, dosis 400	6	113,333	17,671	7,214

### **B) Efecto de la Hb sobre la PAM en el grupo control**

**ANOVA efecto de la Hb sobre la PAM en el grupo control**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	2275,375	455,075		
Hb	3	382,125	127,375	2,208	0,1294
Error intragrupo	15	865,125	57,675		



t de Student para datos pareados:

- PA basal – FC dosis 100:  $p = 0,0943$
- PA dosis 100 – dosis 200:  $p = 0,8459$
- PA dosis 200 – dosis 400:  $p = 0,5927$
- PA basal – dosis 200:  $p = 0,1108$
- PA basal – dosis 400:  $p = 0,0902$

### C) Efecto de la Hb sobre la PAM en el grupo séptico

ANOVA para el efecto de la Hb sobre la PAM en el grupo séptico

	gl	SC	MC	F	p
Subject	5	3798,375	759,675		
Tratamiento	3	4520,792	1506,931	72,575	<0,0001
Error intragrupo	15	311,458	20,764		

t de Student para datos pareados:

- PA basal – dosis 100:  $p < 0,0001$
- PA dosis 100 – dosis 200:  $p < 0,0001$
- PA dosis 200 – dosis 400:  $p = 0,0496$
- PA basal – dosis 200:  $p < 0,0001$
- PA basal – dosis 400:  $p < 0,0001$
- PA 100 – dosis 400:

## 3.- ACCIÓN SOBRE LA PRESIÓN EN LA ARTERIA PULMONAR

### A) Efectos globales

ANOVA efecto de la Hb sobre la PAP

	gl	SC	MC	F	p
sep	1	1408,333	1408,333	13,891	0,0039
Error	10	1013,833	101,383		
Hb	3	1524,833	508,278	24,535	<0,0001
Hb * sepsis	3	63,167	27,722	1,338	0,2805
Error intragrupo	30	621,500	20,717		

**Valores medios de PAP**  
**Efecto dosis-respuesta de la Hb (sepsis-control)**

	N	Media	SD	ES
C, dosis 0	6	16,667	2,422	0,989
C, dosis 100	6	26,500	10,464	4,272
C, dosis 200	6	29,000	9,295	3,795
C, dosis 400	6	32,500	7,204	2,941
S, dosis 0	6	30,333	2,944	1,202
S, dosis 100	6	33,500	2,510	1,025
S, dosis 200	6	36,833	7,167	2,926
S, dosis 400	6	45,333	2,658	1,085

**B) Efectos sobre el grupo Control:**

**ANOVA: Efecto de la Hb sobre la PAP en el grupo control**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	840,333	168,067		
Hb	3	831,000	277,000	9,708	0,0008
Error intragrupo	15	428,000	28,533		

t de Student para datos pareados:

- PAP basal – dosis 100:  $p = 0,0753$
- PAP dosis 100 – dosis 200:  $p = 0,0699$
- PAP dosis 200 – dosis 400:  $p = 0,1777$
- PAP basal – dosis 200:  $p = 0,0213$
- PAP basal – dosis 400:  $p = 0,0034$

**C) Efectos sobre el grupo Séptico:**

**ANOVA: Efecto de la Hb sobre la PAP en el grupo séptico**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	173,500	34,700		
Hb	3	777,000	259,000	20,078	<0,0001
Error intragrupo	15	193,500	12,900		

**4.- EFECTO DE LA Hb SOBRE EL INDICE CARDIACO**

**A) Efectos globales**

**ANOVA: Efecto de la Hb sobre el IC**

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	96,678	96,678	0,065	0,8040
Error	10	14883,018	1488,302		
Hb	3	4527,969	1509,323	27,451	<0,0001
Hb * sepsis	3	167,229	55,743	1,014	0,4003
Error intragrupo	30	1649,496	54,983		

**Valores medios de IC**  
**Efecto dosis-respuesta de la Hb sobre el IC**

	N	Media	DS	ES
C, dosis 0	6	63,091	8,105	3,309
C, dosis 100	6	46,587	10,093	4,120
C, dosis 200	6	40,077	12,790	5,221
C, dosis 400	6	36,806	9,072	3,704
S, dosis 0	6	62,391	36,725	14,993
S, dosis 100	6	52,752	24,937	10,181
S, dosis 200	6	47,030	23,170	9,459
S, dosis 400	6	35,743	19,637	8,017

**B) Efectos sobre el grupo control**

**ANOVA efecto de la Hb sobre el IC en el grupo control**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	1965,063	393,013		
Hb	3	2462,520	820,840	120,525	<0,0001
Error intragrupo	15	102,158	6,811		

t-Test para datos pareados:

- IC basal – IC dosis 100: p <0,0001
- IC dosis 100 – dosis 200: p = 0,0042
- IC dosis 200 – dosis 400: p = 0,1023

**C) Efectos sobre el grupo séptico**

**ANOVA efecto de la Hb sobre el IC en el grupo séptico**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	12917,954	2583,591		
Hb	3	2232,677	744,226	7,215	0,0032
Error intragrupo	15	1547,338	103,156		

**5.- EFECTO DE LA HEMOGLOBINA SOBRE LA RESISTENCIA VASCULAR SISTÉMICA**

**A) Efectos globales**

**ANOVA para RVS**

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	1,298	1,298	0,243	0,6324
Error intragrupo	10	53,335	5,334		
Hb	3	27,796	9,265	19,663	<,0001
Hb * sepsis	3	2,750	0,917	1,946	0,1435
Error intragrupo	30	14,136	0,471		

**Valores medios de RVS****Efecto dosis respuesta de la Hb (control – sepsis)**

	N	Media	DS	ES
C, previo	6	1,821	0,326	0,133
C, 100	6	2,593	0,600	0,245
C, 200	6	3,355	1,685	0,688
C, 400	6	3,444	1,133	0,462
S, previo	6	1,421	0,799	0,326
S, 100	6	2,023	0,961	0,392
S, 200	6	2,547	1,330	0,543
S, 400	6	3,906	2,361	0,964

**a) Efectos sobre el grupo control****ANOVA para RVS**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	16,945	3,389		
Hb	3	10,344	3,448	8,609	0,0015
Error intragrupo	15	6,008	0,401		

**Comparaciones múltiples: “t” con corrección de Bonferroni**

- basal – dosis 100 =  $0,0032 \times 6 = 0,0192$
- dosis 100 – dosis 200 =  $0,1727 \times 6 = 1,0362$
- dosis 200 – dosis 400 =  $0,7123 \times 6 = 4,2738$
- basal – dosis 200 =  $0,0411 \times 6 = 0,2466$
- basal – dosis 400 =  $0,005 \times 6 = 0,03$
- dosis 100 – dosis 400 =  $0,02 \times 6 = 0,12$

**C) Efectos sobre el grupo séptico****ANOVA Table for rvs**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	36,390	7,278		
Hb	3	20,202	6,734	12,427	0,0002
Error intragrupo	15	8,128	0,542		

**Comparaciones múltiples: “t” con corrección de Bonferroni**

- basal – dosis 100 =  $0,0007 \times 6 = 0,0042$
- dosis 100 – dosis 200 =  $0,0201 \times 6 = 0,1206$
- dosis 200 – dosis 400 =  $0,0282 \times 6 = 0,1692$
- basal – dosis 200 =  $0,0045 \times 6 = 0,027$
- basal – dosis 400 =  $0,0137 \times 6 = 0,0822$
- dosis 100 – dosis 400 =  $0,0253 \times 6 = 0,1518$

## 5.- EFECTOS DE LA HEMOGLOBINA SOBRE EL FLUJO MESENTÉRICO/Kg

**A) Efectos globales**

ANOVA efecto de la Hb sobre el flujo mesentérico

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	10,495	10,495	1,743	0,2162
Error	10	60,223	6,022		
Hb	3	45,220	15,073	29,854	<0,0001
Hb * sepsis	3	17,700	5,900	11,685	<0,0001
Error intragrupo	30	15,147	0,505		

**Test de Bonferroni: diferencia SEPSIS-CONTROL**

- dosis 100: p = 0,0164
- dosis 200: p = 0,0344
- dosis 400: p = NS

Valores medios de Flujo mesentérico/kg  
Efecto dosis respuesta de la Hb (sepsis-control)

	N	Medias	DS	ES
C, dosis 0	6	6,118	2,212	0,903
C, dosis 100	6	3,079	1,735	0,708
C, dosis 200	6	3,141	1,617	0,660
C, dosis 400	6	2,889	1,586	0,648
S, dosis 0	6	5,399	0,493	0,201
S, dosis 100	6	5,487	1,089	0,445
S, dosis 200	6	4,865	0,605	0,247
S, dosis 400	6	3,217	0,492	0,201

**B) Efectos sobre el grupo control**

ANOVA efecto de la Hb sobre el Qmes en el grupo control

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	54,622	10,924		
Hb	3	42,950	14,317	20,339	<0,0001
Error intragrupo	15	10,559	,704		

t –Test para datos pareados:

- Qmes basal – dosis 100: p = 0,0054 x 6 = 0,0324
- Qmes dosis 100 – dosis 200: p = 0,7059 x 6 = 4,23
- Qmes dosis 200 – dosis 400: p = 0,2843 x 6 = 1,7058
- Qmes basal – dosis 200: p = 0,0060 x 6 = 0,036
- Qmes basal – dosis 400: p = 0,0056 x 6 = 0,0336
- Qmes 100 – dosis 400: p = 0,148 x 6 = 0,888

**C) Efectos sobre el grupo Séptico:**

ANOVA efecto de la Hb sobre el Qmes en el grupo séptico

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	5,601	1,120		
Hb	3	19,970	6,657	21,761	<0,0001
Error intragrupo	15	4,588	,306		

t de Student para datos pareados:

- Qmes basal – dosis 100:  $p = 0,7534 \times 6 = 4,52$
- Qmes dosis 100 – dosis 200:  $p = 0,0005 \times 6 = 0,003$
- Qmes dosis 200 – dosis 400:  $p = 0,0007 \times 6 = 0,0021$
- Qmes basal – dosis 200:  $p = 0,0288 \times 6 = 0,1728$
- Qmes basal – dosis 400:  $p = 0,0084 \times 6 = 0,0504$
- Qmes 100 – dosis 400:  $p = 0,0049 \times 6 = 0,0294$

**6.- EFECTOS DE LA HEMOGLOBINA EN EL FLUJO PORTAL/Kg****a) Efectos globales**

ANOVA efecto de la Hb sobre el Qp/kg

	gl	SC	MC	F	p
Sepsis	1	3,392	3,392	0,087	0,7737
Error	10	388,557	38,856		
Hb	3	120,765	40,255	18,823	<0,0001
Hb * sepsis	3	24,422	8,141	3,807	0,0201
Error intragrupo	30	64,157	2,139		

**Test de Bonferroni: diferencia SEPSIS-CONTROL**

- basal:  $p = 0,3711$
- dosis 100:  $p = 0,4059$
- dosis 200:  $p = 0,8976$
- dosis 400:  $p = 0,4071$

**Valores medios de Qp/kg**

Efecto dosis-respuesta de la Hb (control-sepsis)

	N	Media	DS	ES
C, dosis 0	6	12,392	4,645	1,896
C, dosis 100	6	8,245	2,961	1,217
C, dosis 200	6	8,092	3,574	1,459
C, dosis 400	6	7,864	3,706	1,513
S, dosis 0	6	10,317	2,810	1,147
S, dosis 100	6	9,651	2,622	1,070
S, dosis 200	6	8,344	3,019	1,233
S, dosis 400	6	6,155	3,113	1,271

**B) Efectos sobre el grupo control****ANOVA efecto de la Hb sobre el Qp/kg en el grupo control**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	252,704	50,541		
Hb	3	84,614	28,205	13,171	0,0002
Error intragrupo	15	32,121	2,141		

t de Student para datos pareados:

- Qp basal – dosis 100:  $p = 0,0117 \times 6 = 0,0702$
- Qp dosis 100 – dosis 200:  $p = 0,5901 \times 6 = 3,5406$
- Qp dosis 200 – dosis 400:  $p = 0,4323 \times 6 = 2,5938$
- Qp basal – dosis 200:  $p = 0,0116 \times 6 = 0,0696$
- Qp basal – dosis 400:  $p = 0,0153 \times 6 = 0,0918$
- Qp 100 – dosis 400:  $p = 0,836 \times 6 = 5,016$

**D) Efectos sobre el grupo séptico****ANOVA efecto de la Hb sobre el Qp/kg en el grupo control**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	135,853	27,171		
Hb	3	60,573	20,191	9,454	0,0009
Error intragrupo	15	32,036	2,136		

t de Student para datos pareados:

- Qp basal – dosis 100:  $p = 0,5169 \times 6 = 3,10$
- Qp dosis 100 – dosis 200:  $p = 0,1327 \times 6 = 0,7962$
- Qp dosis 200 – dosis 400:  $p = 0,0278 \times 6 = 0,1668$
- Qp basal – dosis 200:  $p = 0,0022 \times 6 = 0,0132$
- Qp basal – dosis 400:  $p = 0,0004 \times 6 = 0,0024$
- Qp 100 – dosis 400:  $p = 0,0006 \times 6 = 0,0036$

**7.- EFECTO DE LA HEMOGLOBINA SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE FLUJO PORTAL****b) Efectos globales:****ANOVA efecto de la Hb sobre el índice Qp/IC x 100**

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	116,412	116,412	0,267	0,6168
Error	10	4364,947	436,495		
Hb	3	51,228	17,076	1,605	0,2090
Hb * sepsis	3	24,903	8,301	0,780	0,5144
Error intragrupo	30	319,252	10,642		

**Valores medios del Qp/IC x 100**  
**Efecto dosis-respuesta de la Hb (sepsis-control)**

	N	Media	DS	ES
C, dosis 0	6	19,706	6,988	2,853
C, dosis 100	6	17,632	4,601	1,878
C, dosis 200	6	20,981	7,339	2,996
C, dosis 400	6	21,372	7,641	3,119
S, dosis 0	6	21,543	10,581	4,320
S, dosis 100	6	23,114	12,318	5,029
S, dosis 200	6	23,066	13,185	5,383
S, dosis 400	6	24,428	17,806	7,269

**b) Efecto sobre el flujo portal en el grupo control**

**ANOVA para el % de Qportal**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	779,953	155,991		
Hb	3	51,083	17,028	1,945	0,1657
Error intragrupo	15	131,322	8,755		

**c) Efecto sobre el flujo portal en el grupo séptico**

**ANOVA para el % de Qportal**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	3584,994	716,999		
Hb	3	25,048	8,349	,666	0,5856
Error intragrupo	15	187,931	12,529		

**8.- EFECTO DE LA HEMOGLOBINA SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE FLUJO PORTAL**

**A) Efectos globales de la Hb sobre la distribución de flujo mesentérico**

**ANOVA para %Qmes**

	gl	SC	MC	F	p
Tiempo	1	292,093	292,093	1,782	,2115
Error	10	1639,423	163,942		
Hb	3	12,816	4,272	1,115	0,3587
Hb * sepsis	3	37,649	12,550	3,274	0,0346
Error intragrupo	30	114,987	3,833		

**Test de Bonferroni: diferencia SEPSIS-CONTROL**

- previo: p = 0,4613
- dosis 100: p = 0,1062



- dosis 200:  $p = 0,2185$
- dosis 400:  $p = 0,2398$

**Valores medios %Qmes****Efecto dosis respuesta de la Hb (sepsis – control)**

	N	Media	DS	ES
C, dosis 0	6	9,558	2,663	1,087
C, dosis 100	6	6,560	3,096	1,264
C, dosis 200	6	8,421	4,340	1,772
C, dosis 400	6	7,959	3,850	1,572
S, dosis 0	6	12,260	8,216	3,354
S, dosis 100	6	13,964	9,732	3,973
S, dosis 200	6	14,084	9,630	3,931
S, dosis 400	6	11,926	6,753	2,757

**B) Efectos sobre el grupo control****ANOVA para %Q mes**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	174,141	34,828		
Hb	3	27,717	9,239	1,788	0,1927
Error intragrupo	15	77,522	5,168		

**C) Efectos sobre el grupo séptico****ANOVA para %Qmes**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	1465,282	293,056		
Hb	3	22,748	7,583	3,036	0,0619
Error intragrupo	15	37,465	2,498		

**9.- EFECTO DE LA HEMOGLOBINA SOBRE LA RESISTENCIA VASCULAR MESENTÉRICA****a) Efectos globales****ANOVA para RVM**

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	9865,666	9865,666	3,530	0,0897
Error	10	27950,865	2795,087		
Hb	3	6036,609	2012,203	5,992	0,0025
Hb * sepsis	3	2261,928	753,976	2,245	0,1034
Error intragrupo	30	10075,200	335,840		

**Valores medios de RVM**  
**Efecto dosis respuesta de Hb (sepsis – control)**

	N	Media	DS	ES
C, dosis 0	6	22,043	9,663	3,945
C, dosis 100	6	63,184	59,156	24,150
C, dosis 200	6	56,861	43,117	17,602
C, dosis 400	6	61,272	46,101	18,821
S, dosis 0	6	14,036	2,126	0,868
S, dosis 100	6	17,987	3,274	1,337
S, dosis 200	6	21,359	2,690	1,098
S, dosis 400	6	35,287	2,365	0,965

**b) Efecto sobre el grupo control**

**ANOVA para RVM**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	27899,772	5579,954		
Hb	3	6760,271	2253,424	3,385	0,0461
Error intragrupo	15	9985,936	665,729		

**c) Efecto sobre el grupo séptico**

**ANOVA para la RVM**

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	51,093	10,219		
Hb	3	1538,265	512,755	86,164	<,0001
Error intragrupo	15	89,264	5,951		

## 5. EFECTOS HEMODINÁMICOS DEL GSH

### 1.- EFECTO DEL GSH SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL

#### ANOVA: efecto del GSH sobre la PAM

	gl	SC	MC	F	p
tiempo	1	126,750	126,750	2,617	0,1214
tiempo * sepsis	1	341,333	341,333	7,049	0,0152
tiempo * hb	1	65,333	65,333	1,349	0,2591
tiempo * sepsis * Hb	1	2,083	2,083	0,043	0,8378
Error intragrupo	20	968,500	48,425		

#### a) Efecto del glutatión sobre los animales que no reciben Hb

#### ANOVA el efecto del GSH sobre la PAM

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	5922,042	5922,042	17,007	0,0021
Error	10	3482,083	348,208		
GSH	1	5,042	5,042	,433	0,5253
GSH * sepsis	1	145,042	145,042	12,459	0,0054
Error intragrupo	10	116,417	11,642		

#### Valores medios de PAM (Control – sepsis / Sin Hb – Hb)

	N	Media	DS	ES
C, sin Hb, pre	6	102,833	4,309	1,759
C, sin Hb, post	6	98,833	5,231	2,136
C, Hb, pre	6	137,667	9,266	3,783
C, Hb, post	6	137,500	7,369	3,008
S, sin Hb, pre	6	66,500	17,120	6,989
S, sin Hb, post	6	72,333	19,511	7,965
S, Hb, pre	6	123,000	13,550	5,532
S, Hb, post	6	134,333	29,029	11,851

#### b) Efecto del glutatión sobre los animales que reciben Hb

#### ANOVA efecto del GSH sobre la PAM

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	477,042	477,042	0,958	0,3508
Error	10	4980,083	498,008		
GSH	1	108,375	108,375	1,284	0,2836
GSH * sepsis	1	301,042	301,042	3,566	0,0883
Error intragrupo	10	844,083	84,408		

## 2.- EFECTO DEL GLUTATION SOBRE LA PAP

## ANOVA efecto del GSH sobre la PAP

	gl	SC	MC	F	p
GSH	1	8,333	8,333	0,732	0,4025
GSH * sepsis	1	60,750	60,750	5,333	0,0317
GSH * hb	1	24,083	24,083	2,114	0,1615
GSH * sepsis * hb	1	12,000	12,000	1,053	0,3170
Error intrasujeto	20	227,833	11,392		

Valores medios de PAP  
(Control – sepsis / Sin Hb – Hb)

	N	Media	DS	ES
C, Sin Hb, pre	6	17,000	2,191	0,894
C, Sin Hb, post	6	18,000	2,683	1,095
C, Hb, pre	6	38,000	7,127	2,910
C, Hb, post	6	34,167	5,565	2,272
S, Sin Hb, pre	6	38,000	2,530	1,033
S, Sin Hb, post	6	41,500	9,935	4,056
S, Hb, pre	6	41,667	5,610	2,290
S, Hb, post	6	44,333	7,967	3,252

## a) Efecto del glutation en los animales que NO reciben Hb

## ANOVA efecto del GSH sobre la PAP

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	2970,375	2970,375	75,630	<0,0001
Error	10	392,750	39,275		
GSH	1	30,375	30,375	1,576	0,2379
GSH * sepsis	1	9,375	9,375	0,486	0,5014
Error intragrupo	10	192,750	19,275		

## b) Efecto del glutation en los animales que reciben Hb

## ANOVA efecto del GSH sobre la PAP

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	287,042	287,042	3,363	0,0957
Error	10	848,417	84,842		
GSH	1	2,042	2,042	0,582	0,4632
GSH * sepsis	1	63,375	63,375	18,064	0,0017
Error intragrupo	10	35,083	3,508		

## 3.- EFECTO DEL GLUTATION SOBRE EL ÍNDICE CARDIACO

## ANOVA para el efecto del GSH sobre el IC

	gl	SC	MC	F	p
GSH	1	147,301	147,301	9,220	,0065
GSH * sepsis	1	92,046	92,046	5,761	,0262
GSH * hb	1	22,417	22,417	1,403	,2501
GSH * sepsis * hb	1	12,650	12,650	,792	,3841
Error intragrupo	20	319,529	15,976		

Valores medios de IC  
(Control - sepsis / Sin Hb - Hb)

	N	Media	SD	ES
C, Sin Hb, pre	6	79,061	13,729	5,605
C, Sin Hb, post	6	79,455	13,668	5,580
C, Hb, pre	6	30,778	12,293	5,019
C, Hb, post	6	31,852	12,386	5,057
S, Sin Hb, pre	6	65,472	16,370	6,683
S, Sin Hb, post	6	69,362	20,057	8,188
S, Hb, pre	6	53,367	0,859	0,351
S, Hb, post	6	62,033	5,255	2,145

## a) Efecto del glutation sobre los animales que NO reciben Hb

## ANOVA para el efecto del GSH sobre el IC

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	841,901	841,901	1,680	0,2241
Error	10	5012,184	501,218		
GSH	1	27,396	27,396	1,270	0,2860
GSH * sepsis	1	18,225	18,225	0,845	0,3796
Error intragrupo	10	215,657	21,566		

## b) Efecto del glutation sobre los animales que reciben Hb

## ANOVA para el efecto del GSH sobre el IC

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	4177,068	4177,068	26,765	0,0004
Error	10	1560,622	156,062		
GSH	1	142,323	142,323	13,702	0,0041
GSH * sep	1	86,471	86,471	8,325	0,0162
Error intragrupo	10	103,872	10,387		

## 4.- EFECTOS DEL GLUTATION SOBRE LA RESISTENCIA VASCULAR SISTÉMICA

## ANOVA para los efectos del GSH sobre la RVS

	gl	SC	MC	F	p
GSH	1	0,111	0,111	1,333	0,2619
GSH * sepsis	1	0,090	0,090	1,077	0,3118
GSH * hb	1	0,128	0,128	1,536	0,2295
GSH * sepsis * hb	1	0,008	0,008	0,091	0,7659
Error intragrupo	20	1,664	0,083		

Valores medios de RVS  
(Control - sepsis / Sin Hb - Hb)

	N	Media	DS	ES
C, Sin Hb, pre	6	1,270	0,183	0,075
C, Sin Hb, post	6	1,216	0,212	0,086
C, Hb, pre	6	4,549	1,539	0,628
C, Hb, post	6	4,238	1,433	0,585
S, Sin Hb, pre	6	0,916	0,166	0,068
S, Sin Hb, post	6	0,984	0,360	0,147
S, Hb, pre	6	2,154	0,159	0,065
S, Hb, post	6	2,066	0,513	0,209

## a) Efecto del glutation sobre los animales que no reciben Hb

## ANOVA para el efecto del GSH sobre la RVS

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	0,514	0,514	5,057	0,0483
Error	10	1,017	0,102		
GSH	1	3,001E-4	3,001E-4	0,019	0,8934
GSH * sepsis	1	0,023	0,023	1,420	0,2610
Error intragrupo	10	0,159	0,016		

## b) Efecto del glutation en los animales que reciben Hb

## ANOVA para el efecto del GSH sobre la RVS

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	31,289	31,289	14,191	0,0037
Error	10	22,048	2,205		
GSH	1	0,238	0,238	1,584	0,2368
GSH * sepsis	1	0,075	0,075	0,496	0,4974
Error intragrupo	10	1,506	0,151		

## 5.- EFECTO DEL GLUTATION SOBRE EL FLUJO MESENTÉRICO

## ANOVA para el efecto del GSH sobre Qmes

	gl	SC	MC	F	p
GSH	1	45,156	45,156	29,260	<0,0001
GSH * sepsis	1	0,046	0,046	0,030	0,8640
GSH * hb	1	28,119	28,119	18,220	0,0004
GSH * sep * hb	1	1,573	1,573	1,019	0,3248
Error intrgrupo	20	30,865	1,543		

Valores medios de Qmes  
(Control - sepsis / Sin Hb - Hb)

	N	Media	DS	ES
C, Sin Hb, pre	6	7,018	1,674	0,683
C, Sin Hb, post	6	7,003	1,658	0,677
C, Hb, pre	6	4,007	1,818	0,742
C, Hb, post	6	7,778	0,817	0,334
S, Sin Hb, pre	6	4,128	1,214	0,496
S, Sin Hb, post	6	4,961	0,366	0,149
S, Hb, pre	6	3,197	0,872	0,356
S, Hb, post	6	6,368	2,513	1,026

## a) Efecto del glutation en los animales que no reciben Hb

## ANOVA del efecto del GSH sobre el Qmes

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	36,492	36,492	10,966	0,0079
Error	10	33,279	3,328		
GSH	1	1,004	1,004	3,968	0,0737
GSH * sepsis	1	1,080	1,080	4,289	0,0652
Error intrgrupo	10	2,518	0,252		

## b) Efectos del glutation sobre los animales que reciben Hb

## ANOVA para el efecto del GSH sobre el Qmes

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	7,388	7,388	2,745	0,1285
Error	10	26,911	2,691		
GSH	1	72,270	72,270	25,494	0,0005
GSH * sepsis	1	0,539	0,539	0,190	0,6720
Error intrgrupo	10	28,348	2,835		

## 6.- EFECTOS DEL GLUTATION SOBRE EL FLUJO PORTAL

## ANOVA para el efecto del GSH sobre el Qp

	gl	SC	MC	F	p
GSH	1	161,051	161,051	55,183	<0,0001
GSH * sepsis	1	1,723	1,723	0,591	0,4512
GSH * hb	1	101,871	101,871	34,905	<0,0001
GSH * sepsis * hb	1	13,926	13,926	4,772	0,0410
Error intragrupo	20	58,369	2,918		

Valores medios de Qp  
(Control – sepsis / Sin Hb – Hb)

	N	Media	DS	ES
C, Sin Hb, pre	6	13,342	3,741	1,527
C, Sin Hb, post	6	13,394	3,921	1,601
C, Hb, pre	6	5,389	0,426	0,174
C, Hb, post	6	13,422	4,617	1,885
S, Sin Hb, pre	6	7,850	0,638	0,260
S, Sin Hb, post	6	9,298	1,158	0,473
S, Hb, pre	6	5,200	3,405	1,390
S, Hb, post	6	10,321	4,547	1,856

## a) Efecto del glutation en los animales que NO reciben Hb

## ANOVA para el efecto del GSH sobre el Qp

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	137,901	137,901	9,160	0,0128
Error	10	150,547	15,055		
GSH	1	3,373	3,373	6,699	0,0270
GSH * sepsis	1	2,926	2,926	5,810	0,0367
Error intragrupo	10	5,036	,504		

- Efecto en los animales sépticos

## ANOVA Table for Iqport

	gl	SC	MC	F	p
Error	5	3,871	0,774		
GSH	1	6,291	6,291	6,456	0,0518
Error intragrupo	5	4,873	0,975		



## b) Efecto del glutation en los animales que reciben Hb

## ANOVA para el efecto del GSH sobre el Qp

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	16,239	16,239	,753	0,4057
Error	10	215,523	21,552		
GSH	1	259,548	259,548	48,665	<0,0001
GSH * sepsis	1	12,724	12,724	2,386	0,1535
Error intragrupo	10	53,334	5,333		

## 7.- EFECTO DEL GLUTATION SOBRE LA RESISTENCIA MESENTÉRICA

## ANOVA para el efecto del GSh sore la RVM

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	71,818	71,818	,500	0,4876
hb	1	3181,551	3181,551	22,154	0,0001
sepsis * hb	1	26,672	26,672	0,186	0,6711
Error	20	2872,244	143,612		
GSH	1	1564,961	1564,961	12,961	0,0018
GSH * sepsis	1	14,571	14,571	0,121	0,7319
GSH * hb	1	1148,165	1148,165	9,509	0,0059
GSH * sepsis * hb	1	56,558	56,558	0,468	0,5016
Error intragrupo	20	2414,916	120,746		

## Valores medios de RVM

(Control - sepsis / Sin Hb - Hb)

	N	Media	DS	ES
C, Sin Hb, pre	6	15,388	3,752	1,532
C, Sin Hb, post	6	14,818	3,633	1,483
C, Hb, pre	6	42,132	19,775	8,073
C, Hb, post	6	17,658	2,139	0,873
S, Sin Hb, pre	6	17,412	7,824	3,194
S, Sin Hb, post	6	14,705	4,306	1,758
S, Hb, pre	6	42,796	20,118	8,213
C, Hb, post	6	24,868	12,247	5,000

## a) Efecto del glutatión sobre los animales que no reciben Hb

## ANOVA para el efecto del GSH sobre la RVM

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	5,478	5,478	0,123	0,7334
Error	10	446,452	44,645		
GSH	1	16,103	16,103	1,815	0,2076
GSH * sepsis	1	6,857	6,857	0,773	0,3999
Error intrasujeto	10	88,719	8,872		

## b) Efecto del glutatión sobre los animales que reciben Hb

## ANOVA para el efecto del GSH sobre la RVM

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	93,012	93,012	0,363	0,5496
Error	10	2425,792	242,579		
GSH	1	2697,024	2697,024	11,594	0,0067
GSH * sepsis	1	64,271	64,271	0,276	0,6106
Error intragrupo	10	2326,197	232,620		

## 8.- EFECTO DEL GLUTATION SOBRE LA REDISTRIBUCIÓN DE FLUJO

## A) Redistribución al nivel mesentérico

## ANOVA para el efecto del GSH sobre la variación de %Qmes

	gl	SC	MC	F	p
GSH	1	344,996	344,996	11,770	0,0026
GSH * sepsis	1	84,320	84,320	2,877	0,1064
GSH * hb	1	271,057	271,057	9,248	0,0065
GSH * sepsis * hb	1	133,691	133,691	4,561	0,0453
Error intragrupo	20	586,219	29,311		

Valores medios de Qmes  
(Control - sepsis / Sin Hb - Hb)

	N	Media	DS	ES
C, Sin Hb, pre	6	9,165	2,813	1,148
C, Sin Hb, post	6	9,087	2,737	1,117
C, Hb, pre	6	12,780	1,638	,669
C, Hb, post	6	28,883	14,559	5,944
S, Sin Hb, pre	6	6,345	1,396	,570
S, Sin Hb, post	6	7,641	2,045	,835
S, Hb, pre	6	6,009	1,695	,692
S, Hb, post	6	10,135	3,462	1,413

- Efecto del GSH en los animales que no reciben Hb:

**ANOVA para el efecto del GSH sobre la variación del Qmes**

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	27,290	27,290	3,005	0,1137
Error	10	90,826	9,083		
GSH	1	2,227	2,227	1,321	0,2771
GSH * sepsis	1	2,832	2,832	1,681	0,2240
Error intragrupo	10	16,851	1,685		

- Efecto del glutation sobre los animales que reciben Hb:

**ANOVA para el efecto del GSh sobre la variación de %Qmes**

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	976,827	976,827	16,897	0,0021
Error	10	578,121	57,812		
GSH	1	613,826	613,826	10,781	0,0082
GSH * sepsis	1	215,179	215,179	3,779	0,0805
Error intragrupo	10	569,368	56,937		

**B) Redistribución al nivel portal**

**ANOVA para el efecto del GSH sobre la variación de %Qp**

	gl	SC	MC	F	p
GSH	1	863,164	863,164	38,808	<.0001
GSH * sepsis	1	164,099	164,099	7,378	,0133
GSH * hb	1	654,588	654,588	29,431	<.0001
GSH * sepsis * hb	1	279,964	279,964	12,587	,0020
Error intragrupo	20	444,835	22,242		

**Valores medios de Qp  
(Control - sepsis / Sin Hb - Hb)**

	N	Media	DS	ES
C, Sin Hb, pre	6	17,449	5,974	2,439
C, Sin Hb, post	6	17,412	6,089	2,486
C, Hb, pre	6	19,662	6,469	2,641
C, Hb, post	6	44,057	12,564	5,129
S, Sin Hb, pre	6	12,562	2,924	1,194
S, Sin Hb, post	6	14,789	5,757	2,350
S, Hb, pre	6	9,689	6,336	2,587
S, Hb, post	6	17,028	8,011	3,270

- Efectos del GSH en el grupo que no recibe Hb

**ANOVA para el efecto del GSH sobre la variación de %Qp**

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	84,583	84,583	1,598	0,2349
Error	10	529,361	52,936		
GSH	1	7,200	7,200	1,676	0,2245
GSH * sepsis	1	7,691	7,691	1,791	0,2105
Error intragrupo	10	42,954	4,295		

- Efectos en el grupo que reciben Hb

**ANOVA para el efecto del GSh sobre la variación de %Qp**

	gl	SC	MC	F	p
sepsis	1	2053,877	2053,877	18,367	0,0016
Error	10	1118,268	111,827		
GSH	1	1510,552	1510,552	37,587	0,0001
GSH * sepsis	1	436,371	436,371	10,858	0,0081
Error intragrupo	10	401,881	40,188		

## ***DISCUSIÓN***

**CRÍTICA AL MÉTODO:**

El modelo empleado puede cuestionarse desde varios puntos de vista: podría pensarse que el diseño experimental aplicado no es válido, que las técnicas utilizadas para cada una de las mediciones son inadecuadas o bien que el tratamiento estadístico no es el indicado. Por ello, vamos a analizar cada uno de estos aspectos con la finalidad de que la valoración final de resultados sea apropiada.

**1.- EL DISEÑO EXPERIMENTAL NO ES ADECUADO****1.1) SEPSIS PORCINA:**

El diseño aplicado en el modelo de sepsis animal se basa en el estudio de las variables *antes y después* de una determinada exposición, en este caso la infusión de *E. coli*. Este diseño presenta la ventaja de evitar factores de confusión asociados a la variabilidad interindividual que no pueden medirse ni controlarse de ningún modo (ejemplo: variación genética...); es decir, cada individuo actúa como su propio control. Por consiguiente, se logra una mayor precisión estadística y se requirieren menos sujetos que con un estudio de grupos independientes<sup>311</sup>. Las desventajas que puede presentar este tipo de diseño, como el control de circunstancias externas a lo largo del experimento (es decir, si los cambios se deben al tratamiento o bien son fruto de la evolución) se han subsanado mediante la comparación paralela con un grupo control. De esta forma se controlan terceras variables que pueden tener lugar a lo largo del experimento. Los grupos sometidos a estudio son muy homogéneos entre sí, lo que puede comprobarse en el hecho de que las medidas hemodinámicas y bioquímicas antes del estímulo séptico eran muy similares en ambos grupos y las desviaciones estándar obtenidas no son elevadas. Por lo tanto, el diseño experimental aplicado permite apreciar con una elevada sensibilidad los cambios que pueden producirse y además, al introducir un grupo control, se verifica que dichos cambios no tienen lugar por otros factores externos, puesto que lo único que diferencia a cada uno de los grupos es la existencia o no de estímulo séptico (animales control y animales sépticos) o que estén o no sometidos a una determinada intervención (recibir Hb frente a no recibir Hb). Por lo

tanto pensamos que el diseño experimental aplicado es adecuado para el objetivo del presente estudio.

#### A) ¿POR QUÉ ESTA ESPECIE ANIMAL?

El modelo empleado ha sido un modelo porcino con el fin de reproducir en lo posible un estado equiparable a la sepsis humana. Además, este animal permite de un modo fiable el estudio de flujos regionales, puesto que los animales de pequeño tamaño dificultan extraordinariamente esta técnica restándole fiabilidad. Las razones de la falta de correlación entre los modelos animales y la situación clínica incluye varios factores como la complejidad del estado de la enfermedad, la variabilidad de la población de pacientes y el modelo experimental animal empleado.

Cuando se manejan modelos animales con el fin de establecer un cierto paralelismo con la especie humana, hay que tener en cuenta las limitaciones del modelo a seleccionar. Se han utilizado como modelos de sepsis animal ratas, perros y otras especies; aunque las respuestas fisiológicas de cerdos y chimpancés parecen ser más similares a las humanas<sup>312</sup>. A pesar de ello, hay que tener en cuenta que el modelo porcino seleccionado presenta limitaciones:

- a) Es preciso usarlo con precaución en parámetros relacionados con la PAP o el aclaramiento del sistema del retículo endotelial (RES), ya en estos animales, a diferencia de los humanos, el RES es predominante en la región pulmonar debido a los macrófagos intravasculares<sup>313</sup>. Esto produce una respuesta de la PAP que no se observa en humanos.
- b) En cuanto a la sensibilidad a la endotoxina, fluctúa mucho dependiendo de la especie, tan solo el chimpancé presenta una sensibilidad similar a la humana<sup>314</sup>. Por esto, es preciso adecuar la dosis de tal forma que sea capaz de inducir “respuesta séptica”.

#### B) ¿EXISTEN VARIABLES DE CONFUSIÓN EN NUESTRO MODELO?

Una “variable de confusión” es un factor relacionado causalmente con el desarrollo del proceso y asociado con la exposición; no es una consecuencia de dicha exposición. Estas variables distorsionan la interacción entre las variables de interés

pudiendo originar una aparente pero falsa relación causal. Lo más deseable para la abolición de estas variables de confusión es el control de éstas en el diseño del estudio mediante exclusión de individuos en condiciones de comorbilidad o por randomización.

En el modelo de sepsis animal que se ha desarrollado se han seleccionado los individuos con el fin de evitar falsas relaciones causales motivadas por el efecto de variables de confusión. En este modelo, las variables de confusión consideradas han sido:

- **Edad y peso:** Todos los modelos predictores de mortalidad empleados en Unidades de Cuidados Intensivos deben ser ajustados en función de la edad<sup>315</sup>. De forma análoga a la edad, el peso ha sido controlado mediante selección de animales cuyo peso varía entre 26 y 32 kg. En cualquier caso, las dosis administradas han sido siempre ajustadas en función del peso.
- **Enfermedades preexistentes:** Esta circunstancia puede llegar a incrementar la mortalidad y el grado de lesión de un modo incluso más importante que la edad<sup>316</sup>. Todos los animales empleados en este estudio son sanos. Para garantizar este hecho se ha realizado una valoración *intra-individual* ya que se lleva a cabo una comparación de los diversos parámetros antes y después de ser sometidos a la agresión séptica. En los resultados se puede comprobar como la población de animales estudiados presentan unas condiciones basales muy similares entre sí, ya que las desviaciones standard obtenidas para la mayoría de los parámetros son pequeñas. Además, antes del estudio hemodinámico y bioquímico completo al inicio del experimento, los animales eran controlados y estabilizados mediante ventilación mecánica y resucitación con fluidos, que eran ajustados convenientemente en función de los resultados obtenidos en una gasometría arterial realizada antes del comienzo del experimento propiamente dicho. De esta forma, se podía controlar que el estado basal metabólico y respiratorio de los animales fuera muy similar. Al tratarse de un estudio con un grupo control al que se somete a las mismas circunstancias que los animales sépticos, se comprueba que la evolución en los grupos sépticos es sustancialmente diferente a los controles (ver resultados).



### C) ¿ES APROPIADO EL ESTÍMULO SÉPTICO EMPLEADO?

#### 1.-Agente infeccioso:

Uno de los factores más relevantes en el desarrollo de modelos de sepsis animal es la selección del agente infeccioso. Es importante que, en la medida que sea posible, refleje una determinada presentación clínica; hay que considerar la idoneidad de la bacteria, la dosis, la ruta, y la duración de su administración:

- En general, las infecciones por gérmenes Gram-negativo son más virulentas<sup>169</sup> y suponen el 40% de los casos de sepsis clínicas<sup>317</sup>; por este motivo, *E. Coli* es una bacteria de interés clínico.
- Dosis y ruta. La respuesta fisiológica a una infusión rápida de inóculo rico en bacterias virulentas es similar a la observada por un bolo de endotoxina<sup>312</sup>. Por este motivo se ha optado por infundir durante 30' un inóculo cuya concentración bacteriana era de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de *E. coli* que se administraba por vía venosa.
- Duración de la administración. Una vez seleccionado el agente infeccioso hay que considerar que el inóculo sea apropiado en cuanto a la repetibilidad del recuento bacteriano, el grado de crecimiento y la liberación de toxinas, ya que todos estos factores pueden contribuir a la variabilidad individual. Anteriormente se ha demostrado que el inóculo es contante para estos parámetros en todos los experimentos realizados (ver material y métodos).

#### 2.-Estimación de la dosis bacteriana:

Nuestro grupo posee experiencia previa con un modelo similar de sepsis inducida mediante la infusión de *E. coli* vivos en ovejas. El presente modelo de sepsis porcina está basado en el modelo previo de ovejas. Experimentos piloto han identificado que se requiere una dosis similar para producir el deterioro hemodinámico y bioquímico característico de la sepsis. La dosis utilizada en el modelo ovino (1,5 mL de inóculo/kg con un inóculo de concentración  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) origina una situación de acidosis metabólica e hiperlactatemia junto con cambios hemodinámicos sistémicos y regionales: origina hipotensión sistémica, hipertensión pulmonar, disminución global de los flujos regionales ( $Q_m$  y  $Q_p$ ), acidosis, hiperlactatemia y leucopenia (ver

discusión de resultados). Por tanto, pensamos que nuestro modelo reproduce los cambios hemodinámicos y metabólicos característicos de la sepsis.

### 1.2) **SEPSIS HUMANA:**

Uno de los principales inconvenientes que se puede hallar en un diseño experimental cuyo objetivo es estudiar la variación de un parámetro en función de la existencia de una determinada patología (en este caso los niveles de RSNOs en la sepsis), es el establecer de manera precisa los criterios diagnósticos que garanticen la presencia de enfermedad. En el caso de este estudio los pacientes que han sido considerados como sépticos cumplen los criterios de sepsis detallados en el apartado de introducción y en el de material y métodos. Y aquellos que han sido englobados en el grupo de pacientes con shock séptico son aquellos que además de cumplir los criterios de sepsis, requerían el empleo de una o varias drogas vasoactivas. Además se han tenido en cuenta criterios de fallo orgánico con el fin de establecer el grado de afectación del enfermo.

En el estudio de sepsis humana de casos y controles no ha podido aplicarse la comparación pre y post exposición a la infección por razones obvias; aunque sí han sido valorados los niveles de RSNOs durante el estado de shock y una vez resuelto éste, en aquellos individuos en los que se resolvió el shock.

## 2.- **NO SON VÁLIDOS los ESTIMADORES de SÍNTESIS de NO**

El metabolito del NO más ampliamente difundido para la estimación de la producción de óxido nítrico ha sido la medida de nitratos y nitritos. Se ha hallado correlación entre los niveles de nitratos y nitritos y la evolución e incluso la mortalidad en la sepsis<sup>318</sup>. A pesar de ser los metabolitos más estables del NO, existen inconvenientes para la instauración de los nitratos y nitritos como parámetros válidos en la monitorización y consiguiente intervención en estados fisiopatológicos relacionados con la hiperproducción de NO:

- Influencia de la ingesta de nitratos. Es poco probable que este hecho sea relevante en nuestro estudio ya que la concentración de estas sustancias en el agua de bebida no

contaminada está generalmente por debajo de  $10\text{mg/L}^{319}$ , por lo que la ingesta debe ser muy importante para que afecte la concentración plasmática. De igual modo, en este modelo no hay que considerar el consumo de vegetales ricos en nitratos como la lechuga o espinacas<sup>320</sup>. Por otra parte, el diseño del estudio evita este problema al considerar las variaciones antes y después del estímulo séptico, por lo que se observan los cambios que se producen debidos a la inducción séptica.

- Los nitratos y nitritos son eliminados por vía renal. Este hecho conlleva que enfermos con insuficiencia renal presenten niveles elevados de nitratos y nitritos sin que necesariamente implique una sobreproducción de NO. Esta circunstancia de fallo renal es un síntoma muy frecuente en pacientes sépticos. Para una estimación correcta sería necesario valorar conjuntamente los niveles plasmáticos y la excreción urinaria lo que requiere la recolección de orina de 24h con un agente bactericida para evitar la producción bacteriana de nitritos.
- En estados de bacteriemia no son valorables los nitritos ya que determinadas bacterias son capaces de producirlos, lo que resta especificidad a la medida de nitratos y nitritos. Sin embargo, este factor no debe ser considerado en nuestro modelo ya que la bacteria administrada, *E. coli*, no es capaz de generar nitritos como producto metabólico.
- La vida media real de los nitratos y nitritos *in vivo* no es conocida con exactitud, por lo que la obtención intermitente de muestras puede no ser representativo de la producción de NO a tiempo real.

Los nitrosotioles son compuestos que en principio no se ven influenciados por la dieta y al tener una  $t_{1/2}$  más corta (la máxima estimación de la  $t_{1/2}$  de la nitrosoalbúmina ha sido de  $24\text{h}^{241}$ ) permite valorar la producción de NO a tiempo real. Recientemente se ha hallado que en enfermos sépticos sus niveles aumentan en orina<sup>321</sup>. La aplicabilidad de la medida de nitrosotioles en orina es cuestionable ya que la nitrosoalbúmina, nitrosotiol predominante en plasma ( $\sim 80\%$ )<sup>222</sup> no es filtrado por el riñón en sujetos sanos debido al elevado peso molecular de la albúmina. Esto implica que en orina tan solo cabría esperar la presencia de nitrosotioles de bajo peso molecular, lo que representa tan solo una pequeña fracción ( $\sim 20\%$ ) de los presentes en plasma, probablemente a una concentración por debajo de la mínima concentración detectable por esta técnica; por lo que nosotros hemos analizado la concentración sérica de

RSNOs.

La estimación de metahemoglobina ha sido considerada como posible parámetro indicador de la producción de NO. Una de las interacciones que sufre el NO es su reacción con la deoxihemoglobina para formar nitrosil-hemoglobina<sup>322</sup> cuya descomposición conduce a la formación de metahemoglobina. Sin embargo, la metahemoglobina es degradada casi instantáneamente por la metahemoglobin-reductasa fisiológica<sup>323,324</sup> lo que teóricamente desaconsejaría este método, a pesar de lo cual se han hallado niveles elevados en niños sépticos<sup>325</sup>.

Por lo tanto, teniendo en cuenta todos estos aspectos, los RSNOs aparecen como parámetro que *a priori* presenta importantes ventajas frente a la medida de nitratos y nitritos; si bien no existe aún experiencia sobre la asociación de sus niveles con patologías concretas. Ya se comentará con detalle en la discusión de resultados que éste es el primer trabajo que pone de manifiesto que en la sepsis y en el shock séptico clínicos se produce un incremento de la concentración de RSNOs. Este incremento también sucede en el modelo animal; en el cual, debido a las características del experimento, los nitratos y nitritos también pueden ser un parámetro válido.

### 3.- **LA NITROTIROSINA COMO BIOINDICADOR de la LESIÓN MEDIADA por ONOO**

La propuesta de los peroxinitritos como moléculas que contribuyen al daño tisular cada vez está cobrando mayor importancia. La evidencia mayoritariamente aceptada para demostrar este hecho, es el hallazgo de niveles incrementados de nitrotirosina, lo que implica asumir que la formación de nitrotirosina es un marcador específico de la producción de ONOO<sup>•</sup>. Halliwell<sup>326</sup> ha realizado recientemente una revisión de este supuesto y considera que si bien la mayor parte de la nitrotirosina existente es consecuencia de la reacción de los peroxinitritos con las aminas proteicas, hay que considerar que la nitración de proteínas puede estar originada además por otras especies.

Otras reacciones que hipotéticamente pueden generar "3-nitrotirosina"

- *Óxido nítrico*: No es un hecho probado pero es una posibilidad factible que el ataque de los radicales libres generados en los procesos de inflamación provoque la conversión de tirosina en Tyr-O·, que seguida de la adición de NO· pueda generar nitrotirosina<sup>326</sup>. Esta nitración proteica puede implicar pérdida de funcionalidad y por lo tanto lesión mediada por NO·.
- *Dióxido de nitrógeno*. Las fuentes habituales de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> son el humo del tabaco y determinadas condiciones ambientales<sup>327</sup> que no tienen lugar en nuestro experimento. Su producción endógena es minoritaria y su origen puede ser la oxidación de NO·, oxidación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y quizá ONOO<sup>-</sup> a pH fisiológico; todas ellas especies relacionadas con la producción de NO<sup>326</sup>.
- *Ácido nitroso*. Fisiológicamente su formación es poco probable, tan solo podría tener lugar en tejidos con un pH bajo como el estómago<sup>328</sup>.
- *NO<sub>2</sub>Cl*. Se está estudiando la posibilidad de que el ácido hipocloroso generado en los procesos de inflamación por los neutrófilos activados, pueda reaccionar con NO<sub>2</sub><sup>-</sup> generando NO<sub>2</sub>Cl capaz de interactuar con tirosina<sup>329</sup>.
- *Mieloperoxidasa*. Es posible que el sistema mieloperoxidasa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxide la tirosina a radical-tirosina pudiendo así reaccionar con NO<sub>2</sub><sup>-</sup> para formar nitrotirosina<sup>168</sup>, pero nuevamente no está probado que este hecho tenga lugar *in vivo*.

Según los conocimientos que existen actualmente sobre la especificidad de la nitrotirosina, se puede concluir que en las condiciones experimentales de nuestro estudio, los peroxinitritos son el origen fundamental de la formación de nitrotirosina, ya que no se da una atmósfera rica en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y no se ha probado que existan otras reacciones que conduzcan a la formación de nitrotirosina *in vivo*. Sin embargo, no hay que descartar que en un futuro puedan surgir otras posibles fuentes, si bien todas las consideradas hasta el momento, están relacionadas con el NO o alguno de sus metabolitos, por lo que indicarían igualmente lesión mediada por NO.

Por este motivo hemos considerado que la tinción inmunohistoquímica de nitrotirosina es un indicador válido para estimar la lesión tisular mediada por ONOO<sup>-</sup> y debido al escaso número de estudios realizados en modelos de sepsis agudas, pensamos que puede ser de extraordinaria relevancia esta determinación para comprender aspectos fisiopatológicos de la sepsis.

#### 4.- **NO SE HA CONSIDERADO QUÉ FACTORES INFLUYEN en los EFECTOS de la Hb**

Una de las cuestiones que pueden plantearse al considerar la validez de los resultados obtenidos, es que no se hayan tenido en cuenta una serie de factores que pueden alterar o de algún modo influir en la respuesta hemodinámica de la Hb como son: la propia elaboración de la solución de Hb, el grado de oxigenación de ésta (puesto que de ello depende el tipo de interacción con el NO) y la dosis a administrar.

##### 2.1) PROCESO DE AISLAMIENTO DE Hb

Se ha demostrado que las soluciones de hemoglobina poseen ciertas propiedades como potenciales resucitadores en el shock<sup>330</sup>. Estas soluciones tienen la ventaja de que son fácilmente almacenables y poseen una presión coloidosmótica similar a la albúmina<sup>273</sup> y a la del dextrano-70<sup>285</sup> lo que puede suponer un efecto beneficioso durante la resucitación. Sin embargo, existen diversos efectos indeseables que pueden ser atribuibles a la preparación de dicha disolución:

1. Puesto que el agente lisante de hematíes es el agua, la solución resultante es hipotónica con respecto al plasma con la consecuente acción hemolizante. Para evitar este problema la solución obtenida ha sido osmóticamente compensada con una solución saturada de cloruro sódico.
2. El mayor peligro de las soluciones de hemoglobina es la presencia de antígenos del tipo ABO que pueden provocar una grave reacción hemolítica transfusional. Sin embargo, al perder su integridad la membrana del hematíe, esta capacidad antigénica disminuye reduciéndose a una pequeña hemólisis.

3. Los tetrámeros de hemoglobina se disocian en monómeros y dímeros que son excretados por vía renal. La dosis administrada está pensada en función de su potencial farmacológico con el fin de alcanzar en cada caso un efecto máximo aún teniendo en cuenta que posee un metabolismo.
4. La dificultad final asociada a las soluciones de hemoglobina es el incremento de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno debido a la pérdida del efecto del 2,3-difosfoglicerato que en circunstancias fisiológicas reduce dicha afinidad. Aunque este hecho no interfiere en el objetivo último de nuestro estudio, sí que es un factor a tener en cuenta a la hora de justificar las lesiones histológicas producidas por la hemoglobina debidas a un defecto en la oxigenación.

## **B) CAPACIDAD DE LA Hb PARA INTERACCIONAR CON ÓXIDO NÍTRICO**

Uno de los objetivos de este estudio es valorar la capacidad de la Hb como agente con propiedades hemodinámicas aplicables al tratamiento del shock séptico. Como ya se ha comentado extensamente en apartados previos, la principal causa de estos efectos es la capacidad de la Hb como molécula captadora de NO. Por ello, vamos a analizar los diferentes factores que pueden influir en dicha interacción.

### 1. Dependencia del tipo de Hb:

La capacidad fijadora de NO de la Hb aún no está plenamente caracterizada. Jia y colaboradores demostraron que el NO se une a los grupos reactivos sulfidrilos de la HbA<sup>253</sup>. Además de esta unión, también el NO interacciona con el hierro del grupo hemo<sup>257</sup>. Dicha capacidad fijadora de NO difiere dependiendo de varios factores como el tipo de Hb, el estado de oxigenación, proporción Hb:NO etc. En nuestro estudio la hemoglobina predominantemente empleada ha sido oxihemoglobina (92-96% oxiHb) lo que implica mayor interacción del NO con los grupos -SH de las cisteínas presentes en la Hb de los mamíferos.

### 2. Dosis a administrar:

Se podría argumentar que las dosis administradas son muy elevadas, especialmente si se comparan con las que habitualmente se emplean para fármacos

vasoactivos. Sin embargo, en ensayos preliminares realizados en nuestra unidad de investigación se comprobó que dosis inferiores a 100mg/kg/h no originan efectos hemodinámicos aparentes. La dosis de 100mg/kg/h produce hipertensión leve pero no significativa. Por eso, el estudio se ha diseñado de tal forma que se administran dosis crecientes de Hb a partir de la dosis mínima que produce efectos hemodinámicos en nuestro modelo. Estos resultados coinciden con los reportados previamente en un modelo similar<sup>285</sup>.

#### 5.- ¿PUEDE el GSH MODULAR la UNIÓN Hb-NO?

Como ya se ha expuesto previamente, nuestra hipótesis es que el GSH "compite" con la Hb por el NO a través de equilibrios que se establecen entre el GSH y el NO unido a grupos -SH de la Hb. Para demostrarlo, se ha administrado GSH después de la infusión de Hb con la finalidad de comprobar si es capaz de revertir los efectos vasculares de ésta. Antes de valorar estas acciones, hay que considerar previamente los posibles factores que pueden afectar:

##### a) Dosis:

La dosis de bolos de 1g GSH se ha calculado para que el glutatión esté presente en una proporción superior a la igualdad mol a mol con respecto a la Hb, garantizando su concentración en exceso.

##### b) Posible interferencia del GSH contenido en la solución de Hb:

La hemoglobina aislada mediante lisado eritrocitario no garantiza la ausencia del glutatión que éstos contenían después de la purificación. Sin embargo, el efecto sobre nuestro ensayo es despreciable, ya que al estar sometida la Hb a un proceso prolongado en presencia de oxígeno, la porción residual de glutatión se encuentra fundamentalmente en su forma oxidada, lo que impide la formación de GSNO<sup>384</sup>.

##### C) Repercusión de la medida del gasto cardíaco

El gasto cardíaco se ha medido por la técnica de termodilución y cada una de las



medidas se ha realizado por triplicado, tomando la media como el valor adecuado. Ya que se requiere aproximadamente 60 segundos para realizar la medición por triplicado, los efectos reales de GSH sobre la resistencia sistémica posiblemente han sido subestimados debido a lo transitorio de los cambios observados.

#### 7.- **EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO NO ES APLICABLE A ESTE MODELO**

Se puede plantear la duda de la conveniencia de aplicar un análisis de la varianza de medidas repetidas con varios factores para estimar la variación de un parámetro o medida a lo largo de un periodo de tiempo. Como se expone a continuación nosotros hemos analizado detalladamente las condiciones de aplicación de este test y hemos verificado que la herramienta utilizada (programa Stat View) realiza este análisis de forma satisfactoria.

#### **Condiciones de aplicación del análisis estadístico:**

En el análisis de la varianza las observaciones deben cumplir los criterios de normalidad, ser observaciones independientes y con la misma varianza en cada una de las subpoblaciones:

- Los grupos estudiados son muestras aleatorias procedentes de una población normal. La no normalidad tiene muy pocos efectos sobre el estadístico de contraste empleado<sup>331,332</sup>, pero debido al tamaño de los grupos se ha aplicado la prueba de Shapiro-Wilks para verificar el supuesto de Normalidad.
- Las observaciones realizadas son independientes. Al igual que la regresión, el análisis de la varianza asume que cada observación en el análisis es independiente de otra; sin embargo, en muchas ocasiones no son independientes ya que se utiliza para valorar medidas en el mismo objeto o individuo a lo largo de un periodo de tiempo. Para realizar este análisis correctamente, los cálculos del análisis de la varianza deben realizarse teniendo en cuenta el hecho de que la variabilidad entre las observaciones tomadas de la misma unidad experimental (como una persona o una planta) es más pequeña que la variabilidad entre diferentes unidades experimentales<sup>333</sup>. Tal análisis es conocido como “medidas repetidas del análisis de

la varianza”. Este aspecto es tenido en cuenta por el programa estadístico empleado “Stat View”. El término “error intragrupo” es automáticamente adicionado en el cálculo de la ANOVA que puede referirse en otras fuentes literarias como “error intrasujeto” o “error alfa”. El programa realiza más de una estimación de la variabilidad para asegurar la importancia de los diferentes efectos en un diseño de medidas repetidas considerando que las variaciones en el mismo individuo son menores que las producidas entre diferentes individuos. El programa calcula las diferencias entre grupos estimando el error residual.

- La igualdad de varianzas se ha verificado mediante el test de Levene.

### **Inconvenientes del análisis de la varianza**

El análisis de la varianza solamente valora la hipótesis de que el comportamiento global de una muestra difiere dependiendo de una o varias características de otra. Sin embargo, no aporta información sobre qué muestra o muestras concretamente difieren de las otras. Para aislar diferencias entre grupos en el análisis de la varianza se ha empleado el “*t* test” con la corrección de Bonferroni<sup>334</sup>.

### **Modo de expresión de resultados**

Los valores medios aparecen expresados en la publicaciones de diversas formas:

- valor medio  $\pm$  desviación standard (SD)
- valor medio  $\pm$  error standard (ES)

Muchos investigadores científicos expresan sus resultados con ES, debido a que con este dato el valor que se obtiene es menor que con DS y por lo tanto la apariencia visual mejora. La desviación standard expresa la certeza con que una muestra puede estimar la media de una población real, mientras que el error standard no informa nada sobre la variabilidad en la población general. Puesto que el lector generalmente está interesado en conocer lo que sucede en la población, los datos no deben ser expresados con el error standar<sup>335</sup>. Por este motivo, nuestro grupo ha optado por la opción de expresarlo como media  $\pm$  SD en detrimento del aspecto visual.

A la vista de estas observaciones, nuestro grupo ha optado por aplicar un análisis de la varianza de medidas repetidas ya que es un test que permite establecer diferencias entre grupos de manera muy exigente, discriminando verdaderamente los comportamientos diferenciales.

## DISCUSIÓN de RESULTADOS

El análisis de los resultados va a englobarse en tres grandes grupos:

- Efectos de la evolución de la sepsis:
  - Alteraciones hemodinámicas.
  - Cambios bioquímicos.
  - Daño mediado por ONOO<sup>•</sup>.
- La Hb como resucitador del shock séptico: efectos de la Hb frente al grupo no tratado y su efecto dosis-respuesta.
- El GSH ¿revierte los efectos hemodinámicos de la Hb?

### 1. CAMBIOS PRODUCIDOS EN LA SEPSIS

#### 1.1) CAMBIOS HEMODINÁMICOS

En los resultados expuestos se puede verificar que en nuestro modelo de sepsis porcina se producen alteraciones coincidentes con el perfil hemodinámico de sepsis descrito en la literatura:

- *Descenso de la Presión Arterial y alteraciones en la FC.*

Como se ha comentado en la introducción, probablemente éste sea el efecto hemodinámico más característico de la sepsis ya que ha sido relacionado con la mortalidad de la misma. En nuestro modelo este descenso tiene lugar a partir de la primera hora de evolución y como se observa en los resultados, el cambio producido después de cuatro horas es cuantitativamente muy importante (64,5%). Como se ha comentado en el apartado de la introducción, este efecto hemodinámico se ha atribuido mayoritariamente a la hiperproducción de óxido nítrico como consecuencia de la acción del TNF- $\alpha$  generado por la endotoxina y otros mediadores capaces de inducir la síntesis de iNOS en determinados tipos celulares.

Existen datos contradictorios en la literatura a cerca del tiempo requerido para que llegue a producirse la expresión de iNOS. Muchos autores sostienen que se

requiere un periodo de cuatro horas para que se produzca dicha inducción. Esta afirmación está basada en que la concentración sérica de nitratos y nitritos no se incrementa hasta pasado este periodo. Sin embargo, los efectos vasculares generados por el NO se observan de manera más precoz. Existen diversas hipótesis que tratan de justificar este hecho:

- El descenso de la PAM se debe a una activación inicial de la eNOS. Este efecto fue observado por Szabó<sup>177</sup>, en un modelo experimental en la que esta sobreexpresión se producía de manera muy precoz. En nuestro experimento no se han observado consecuencias hemodinámicas de este hecho ya que el descenso de PAM, al igual que los otros efectos hemodinámicos, no han tenido lugar en los primeros minutos de la evolución séptica sino que ha sido posterior, por lo que parece que en nuestro modelo este hecho no justificaría los efectos hemodinámicos hallados.
- Investigadores que han medido de manera directa la inducción de la iNOS mediante técnicas moleculares que permiten detectar el mRNA necesario para la síntesis de esta proteína, han hallado que esta inducción de la síntesis de iNOS se producía en torno a los 180 minutos de la inducción séptica<sup>336</sup>, incluso de ha descrito esta expresión en un tiempo de una hora<sup>339</sup>. Según esto, es posible que los metabolitos séricos se incrementen de una forma más retardada que la inducción real de la iNOS. Este hecho justificaría el descenso de PAM observado sin que se incremente la concentración sérica de nitratos y nitritos. En cualquier caso, el tiempo de inducción de la iNOS, además depender del tiempo requerido para la síntesis de proteína, también parece estar influenciado por el tipo y el grado de estímulo séptico, la especie animal considerada y del tejido analizado; es por lo tanto muy dependiente del modelo séptico empleado.
- En un estudio realizado por nuestro grupo con un modelo séptico muy similar a este, se demuestra que la producción de NO sustrato-dependiente tiene lugar entorno a las 2h del estímulo séptico<sup>338</sup>.
- Recientemente se ha puesto de manifiesto que existe una alternativa no enzimática para la síntesis de NO<sup>339</sup>. Esta nueva vía de síntesis parece estar relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno, cuya formación tiene lugar en la sepsis como se ha comentado anteriormente. El incremento del gasto energético celular comienza a manifestarse de forma muy temprana, por lo que se desencadena un importante stress oxidativo que según estos autores contribuye junto a otras especies

nitrogenadas a la síntesis de NO pudiendo propiciar un descenso en la PAM. El hallazgo de esta nueva vía de síntesis hace que a partir de ahora, haya que considerar el stress oxidativo como pieza importante en todas las acciones mediadas por el NO.

Los cambios que se producen en la frecuencia cardiaca posiblemente sean consecuencia de una respuesta simpática desencadenada como mecanismo compensatorio del efecto de la sepsis sobre la PAM.

- ***Incremento de la PAP.***

En nuestro experimento se han observado variaciones en la PAP similares a las reportadas por otros autores<sup>340,341</sup> que han observado un incremento muy pronunciado de la PAP durante el momento de la infusión bacteriana (0,5 horas) y un incremento más moderado a lo largo de la evolución séptica. Este efecto es consecuencia de varios factores:

- Reacción vasoconstrictora como respuesta a la hipoxia que produce la sepsis<sup>342</sup>.
- Agregación de células inflamatorias pulmonares y liberación de mediadores de daño endotelial en el parénquima endotelial (ejemplo: TNF en los macrófagos), si bien esta liberación no parece ocurrir hasta después de 165 minutos<sup>343,344</sup>.
- Incrementos en la presión de la arteria pulmonar y la resistencia vascular pulmonar secundaria a vasoconstricción durante los estados iniciales, y oclusión tromboembólica en las arterias pulmonares en las fases tardías<sup>340,341</sup>.

Existen datos que evidencian el papel de NO en la regulación de este parámetro. Las enzimas responsables de la formación de NO están ampliamente distribuidas en varios tipos celulares del sistema respiratorio<sup>345</sup>, incluyendo las células del endotelio vascular pulmonar. Pearson y col. demostraron que el bloqueo de la síntesis endógena de NO con L-NAME (“N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester”) incrementaba la vasoconstricción pulmonar hipóxica y el tono basal pulmonar en ratones normoxémicos<sup>346</sup>. Este hecho demuestra el papel fisiológico de la producción endógena de NO confiriéndole un papel protector de la circulación pulmonar.

En la sepsis se produce una importante lesión endotelial que induce un descenso

en la actividad de eNOS, responsable de la regulación del tono vascular pulmonar; por lo tanto, se impide que el NO ejerza su papel regulador. Este hecho parece indicar que el NO generado por la iNOS en la sepsis no posee dicho papel regulador o por lo menos no es capaz de contrarrestar el efecto de los mediadores vasoconstrictores liberados en la sepsis a nivel pulmonar. Trabajos realizados con inhibidores selectivos de la iNOS confirman este efecto diferencial del NO generado a nivel endotelial con respecto al sintetizado por los macrófagos; ya que la inhibición con aminoguanidina, inhibidor selectivo de la iNOS; atenúa el daño pulmonar agudo generado por endotoxina<sup>347</sup>, lo que implica que la producción masiva de NO que genera la iNOS puede provocar lesión pulmonar.

Otro posible efecto que podría explicar el incremento de PAP es la oxidación a nivel pulmonar de tioles. Parece demostrarse que en condiciones basales el NO puede estar estabilizado por tioles reducidos (fundamentalmente GSH) generando nitrosotioles con actividad broncodilatadora<sup>348</sup>, de hecho se han detectado concentraciones de GSNO de 0,2-0,5 $\mu$ M en el fluido alveolar<sup>348</sup>. En estado séptico, debido al importante stress oxidativo, los grupos tioles se oxidan provocando la depleción de GSH lo que impide la formación de GSNO y por lo tanto su actividad dilatadora.

- ***Descenso de flujo en lechos vasculares regionales.***

Como se ha comentado en el apartado de la introducción, en el perfil hemodinámico de la sepsis coexisten fenómenos de vasodilatación sistémica junto a otros de vasoconstricción regional que conducen en ocasiones a hipoperfusión en algunos órganos. El órgano más susceptible a la hipoperfusión es el intestino delgado, con este fin se han monitorizado durante el experimento el flujo de la arteria mesentérica y la vena porta. En nuestro modelo de sepsis porcina se ha producido un importante descenso del flujo en ambos vasos. Este descenso de flujo contribuye que se produzcan fenómenos de hipoxia tisular y por lo tanto lesión. Hemos observado que en nuestro modelo se producen ambos fenómenos: descenso del flujo mesentérico y aumento del incremento  $pCO_{2i} - pCO_{2A}$ , junto con incremento de la concentración sérica de lactato y descenso de  $pH_{arterial}$  lo que refleja la coexistencia de acidosis y descenso de flujos regionales. Este efecto no puede atribuirse a descensos del flujo sistémico ya que el gasto cardiaco no se altera significativamente

durante la sepsis. Sin embargo, según los estudios realizados por Vallet<sup>62</sup>, no se puede afirmar que la acidosis que se produce en la mucosa intestinal se deba al déficit de flujo que afecta al lecho vascular mesentérico, ya que el descenso de flujo mesentérico no necesariamente implica descenso de flujo en la mucosa.

Resumiendo, en nuestro modelo de sepsis se produce importantes cambios hemodinámicos:

- Descenso de la PA con cambios en la FC.
- Aumento de la PAP.
- Disminución importante del flujo de la arteria mesentérica y vena porta, junto con alteraciones en la redistribución de flujo en lo que se refiere a la vena porta.

Estas alteraciones coinciden con el perfil hemodinámico de sepsis descrito en la literatura, lo que afianza la validez de nuestro modelo.

## 1.2) ALTERACIONES BIOQUÍMICAS y HEMATOLÓGICAS

Se han observado importantes cambios bioquímicos en el grupo de animales sépticos, revelando que el modelo utilizado reproduce los cambios propios de la sepsis:

- **Descenso del pH arterial** Se produce un importante descenso del pH arterial a partir de la primera hora de evolución. El valor medio final de pH arterial en el grupo séptico, revela que las alteraciones que produce nuestro modelo de sepsis, comprometen de forma importante el estado metabólico y respiratorio del animal.
- **Leucopenia** Tiene lugar una marcada leucopenia también a partir de la primera hora de la inducción de la sepsis, lo que revela redistribución leucocitaria como respuesta al estímulo séptico.
- **Hiperlactatemia** Otro de los efectos metabólicos que comúnmente se manifiesta en la sepsis es el incremento de lactato plasmático. En nuestro experimento comienza a manifestarse esta acción a partir de la tercera hora de inducción séptica. Como ya se ha comentado previamente, el incremento de lactato clásicamente se ha utilizado como indicador de metabolismo anaerobio que sufre incrementos como consecuencia de fenómenos de hipoxia. Los efectos que nosotros hemos observado son coincidentes con el criterio de autores que manifiestan, que si bien la hipoxia



genera habitualmente hiperlactatemia, no siempre la hiperlactatemia es consecuencia de la hipoxia. Como ya se ha comentado ampliamente en la introducción, el incremento de lactato no es un marcador específico de hipoxia por vascularización insuficiente, aunque sí debe considerarse ésta cuando la lactatemia supera los 5 mmol/L. En efecto, nosotros hemos hallado incrementos moderados de la concentración de lactato plasmático en dos animales en los que ni los flujos regionales registrados, ni el gasto cardiaco sufrían alteración, lo que indica que existen otras causas además de la hipoxia que producen el incremento de lactato. Después de cuatro horas de evolución séptica no todos los animales alcanzan cifras superiores a 5 mmol/L, por lo que no podemos afirmar con rotundidad que el incremento de lactato en nuestro modelo se deba enteramente a fenómenos de hipoxia.

- **Hipertrigliceridemia.** Aunque es conocido que la sepsis genera un importante gasto energético y que una consecuencia de ello es el incremento en la concentración de triglicéridos circulantes, nuestro trabajo pone de manifiesto que este efecto sucede ya en las primeras horas de la inducción séptica. Este hecho revela que efectivamente el gasto energético que genera la sepsis es muy precoz y debe contribuir de manera muy importante a la disfunción celular y por lo tanto al fallo multiorgánico incluso en las primeras horas de evolución. La trigliceridemia no es un parámetro que se utilice comúnmente en la clínica como indicador del deterioro energético del paciente séptico. Sin embargo, debido a su incremento precoz, sería recomendable realizar esta determinación en pacientes sépticos con el fin de estimar si se está produciendo un estado de importante demanda energética.
- **Alteraciones de la función renal.** En el transcurso de nuestro experimento no se llegan a producir incrementos significativos en la concentración sérica de creatinina y de urea, aunque la concentración de creatinina parece presentar cierta tendencia a incrementarse en la sepsis. El metabolito nitrogenado que sí sufre un importante incremento durante la sepsis es la concentración de urato. Posiblemente, si el resto de los indicadores de función renal no se ven aún incrementados, el aumento de la uricemia que se observa puede ser consecuencia del gasto energético, ya que el consumo de ATP potencia el metabolismo de adenina aumentando la concentración de urato. Además del fallo renal y la acidosis metabólica, las causas que pueden originar incremento de urato son múltiples: gota, incremento de la destrucción de nucleoproteínas en numerosas enfermedades hematológicas, determinados fármacos

y diversos síndromes caracterizados por alteraciones metabólicas. La determinación de la concentración plasmática de urato es una prueba inespecífica, por lo que no puede ser empleada de forma generalizada como indicador de consumo de ATP. Sin embargo, en nuestro modelo estas alteraciones son descartables, por lo que el incremento de uricemia puede ser interpretado como consecuencia del gasto energético o del fallo renal. Tanto la uricemia como la uremia son parámetros que se ven afectados por la dieta, pero en este modelo no se ha considerado este factor puesto que las medidas se han realizado comparando los valores obtenidos antes y después del estímulo séptico sin que exista ingestión alimentaria durante ese periodo y además, todos los animales estaban sometidos a una dieta muy similar.

- **Marcadores hepáticos.** Los enzimas que habitualmente se utilizan para valorar la funcionalidad hepática en el síndrome de fallo multiorgánico son la AST y ALT junto con la bilirrubinemia. En nuestro modelo, se produce un incremento de la actividad del enzima AST sin que varíe la de ALT. Es conocido que el enzima ALT posee una mayor especificidad hepática, lo que indica que el incremento en la actividad de AST, probablemente tenga su origen por el efecto en otros tejidos como el músculo. Tampoco la concentración sérica de bilirrubina total se incrementa de forma significativa ni alcanza valores por encima de los cuales existan consecuencias clínicas. Esto pone de manifiesto que no hay signos bioquímicos que pongan de manifiesto que se esté produciendo fallo hepático. Sin embargo, el incremento significativo de la concentración de bilirrubina directa, de la actividad de la fosfatasa alcalina, de LDH y de GGT sugieren se está produciendo un cuadro de tipo obstructivo. De estos marcadores, la fosfatasa alcalina es el mejor indicador de obstrucción biliar. Este proceso obstructivo que hemos observado en la sepsis es un fenómeno frecuente en la sepsis clínica donde se produce un cuadro de colestasis intrahepática<sup>349</sup>.
- **Citolisis.** La sepsis produce un incremento de la concentración sérica de los iones fosfato y potasio, ambos intracelulares, que se incrementan en procesos citolíticos. Otro hecho que también tiene lugar en dichos procesos citolíticos y en nuestro experimento, es el incremento de la actividad del enzima LDH. Estos hallazgos pueden ser consecuencia directa del daño celular de la sepsis. Hay que considerar que la concentración sérica de iones es dependiente de la función renal; si bien en nuestro modelo experimental no existen evidencias analíticas de deterioro renal.

- **PARÁMETRO de HIPOPERFUSIÓN REGIONAL: Tonometría  $\Rightarrow$   $p\text{CO}_{2i}$  -  $p\text{CO}_{2A}$ :**

En la actualidad la medida del incremento  $p\text{CO}_{2i}$  -  $p\text{CO}_{2A}$  se considera el parámetro más adecuado como fuente de información del aporte de oxígeno que recibe el intestino. Sin embargo, como se ha comentado extensamente en el apartado de introducción, la validez del método parece estar cuestionada en algunos aspectos.

El aporte de oxígeno es directamente dependiente del grado de vascularización del órgano considerado, de tal forma que si el flujo no es adecuado el torrente sanguíneo no es capaz de transportar el dióxido de carbono generado por los tejidos<sup>350</sup>. Son muchos los autores que han correlacionado el aumento de este incremento con descensos de flujo<sup>351</sup>. Sin embargo, no tenemos conocimiento de que haya estudios que consideren las diferencias existentes en el grado de vascularización entre diferentes segmentos intestinales y como esto puede influir en la lesión hipóxica de la sepsis. Por este motivo, nuestro grupo decidió situar dos tonómetros en zonas con diferente grado de vascularización y así evaluar si dichas diferencias tenían repercusión en el valor del incremento  $p\text{CO}_{2i}$  -  $p\text{CO}_{2A}$  y si la hipoperfusión tisular generada por la sepsis afecta a cada uno de estos tramos de forma diferente.

En nuestro modelo de sepsis se ha producido un aumento significativo del incremento  $p\text{CO}_{2i}$  -  $p\text{CO}_{2A}$  en dos tramos del tracto intestinal. Este hecho revela que en ambas regiones del intestino la sepsis ha generado una acidosis importante que correlaciona con el descenso de flujo observado en el lecho vascular mesentérico. Sin embargo, el comportamiento es diferente en el íleon distal que en el yeyuno proximal. Inicialmente el íleon distal presentaba unos valores basales medios superiores a los del yeyuno proximal. Esta observación es de suma trascendencia ya que se pone de manifiesto que un valor de  $p\text{CO}_{2i}$  -  $p\text{CO}_{2A}$  en un tramo del tracto gastrointestinal no es extrapolable a otras regiones; es decir, parece ponerse de manifiesto que el valor de  $p\text{CO}_{2i}$  -  $p\text{CO}_{2A}$  es consecuencia de un estado metabólico localizado. Esta diferencia basal puede atribuirse a que ambos tramos presentan diferente grado de vascularización. El íleon distal está menos irrigado y por lo tanto presenta una acidosis ligeramente superior. A medida que evoluciona la sepsis las diferencias entre ambos tramos se acentúan, siendo más acusado y más precoz el aumento de  $p\text{CO}_{2i}$  -  $p\text{CO}_{2A}$  en el íleon distal. Este hecho refleja que las zonas con deficiente vascularización son más

susceptibles a fenómenos de hipoxia y por lo tanto a la acidosis. Además del flujo, el contenido de oxígeno sanguíneo también es fundamental para el mantenimiento de una adecuada oxigenación (el aporte de oxígeno es producto del flujo y del contenido de oxígeno). En nuestro modelo experimental se produce un incremento progresivo del hematocrito, lo que implica aumento en la capacidad de transporte de oxígeno. Teniendo en cuenta este hecho, el déficit de aporte de oxígeno en nuestro modelo se debe a los descensos de flujo que provoca la sepsis y las diferencias en el grado de vascularización entre ambos segmentos. Sin embargo, no se puede establecer una relación única entre los flujos y el incremento de  $p\text{CO}_{2i}$  -  $p\text{CO}_{2A}$ , ya que existen factores de tipo metabólico que pueden contribuir al incremento de  $p\text{CO}_2$  luminal.

A la vista de estos resultados, se plantea una importante cuestión de tipo práctico: si el incremento  $p\text{CO}_{2i}$  -  $p\text{CO}_{2A}$  varía en función del grado de vascularización del tramo intestinal ¿tiene aplicación clínica el empleo del tonómetro en los pacientes críticos como indicador de hipoxia intestinal?. Como hemos podido observar en nuestro modelo, la tonometría ha puesto de manifiesto la existencia de alteraciones que generaban en ambos tramos acidosis; por lo tanto, la tonometría está proporcionando información acerca de cambios que están teniendo lugar a nivel tisular. Sin embargo, el hecho de que el diferente grado de vascularización produzca distinto grado de acidosis refleja que los resultados obtenidos por un tonómetro localizado en un determinado tramo, no es extrapolable al resto del tracto intestinal sino que tan solo aporta información del grado de acidosis de una determinada región. Una posible opción sería situar el tonómetro precisamente en aquellas regiones peor vascularizadas y por lo tanto más susceptibles a la hipoxia, de este modo podemos conocer el momento preciso en el que comienzan a producirse alteraciones que puedan finalmente comprometer la funcionalidad del intestino.

- **INDICADORES DE LA PRODUCCIÓN DE NO: RSNOs y nitratos y nitritos.**

Muchos de los estudios realizados hasta el momento muestran una elevada disparidad en cuanto a las concentraciones medias basales de nitratos y nitritos en sangre en humanos (se han estimado concentraciones desde 3nM hasta 20 $\mu$ M)<sup>222,352,353</sup>.

Este hecho puede deberse fundamentalmente a variaciones en la ingesta. Por este motivo hay autores que proponen como mejor opción la medida de nitrosotioles para correlacionar los cambios hemodinámicos con la producción de óxido nítrico. Una de las aportaciones importantes de este trabajo es que se pone de manifiesto la validez de los RSNOs como indicadores de la producción de NO: correlacionan con los efectos hemodinámicos y con los niveles de nitratos y nitritos en un modelo no influenciado por la ingesta ya que se miden sus valores en un periodo corto de tiempo en el que el animal no recibe aporte alimentario. No tenemos conocimiento de que existan trabajos previos que hayan realizado la medida de este parámetro en la sepsis en animales de gran tamaño como el cerdo; tan solo Stamler ha determinado su concentración en ratas donde halló unas concentraciones del orden de 100 nM en las ratas control y 300 nM en las ratas sépticas<sup>222</sup>. Nosotros en los cerdos hemos hallado unas concentraciones del orden de 1,5  $\mu$ M en los animales control y del orden de 4,5  $\mu$ M en los animales sépticos. También se ha medido la concentración de nitratos y nitritos como parámetros estimadores de la producción total de NO, puesto que la variación que existe en cuatro horas no puede atribuirse a la ingesta sino a la producción de óxido nítrico. Como es obvio, las concentraciones halladas son muy superiores, ya que los RSNOs tan solo representan una fracción del NO producido, mientras que los nitratos y nitritos son los metabolitos finales. Debido a que la técnica de medida para determinar nitratos y nitritos difiere en sensibilidad de la empleada para medir RSNOs, no podemos estimar qué proporción del óxido nítrico generado forma dichos compuestos.

### 1.3) EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA de LESIÓN MEDIADA POR ONOO<sup>-</sup>

El descubrimiento del potencial papel citotóxico de los peroxinitritos, consecuencia de la reacción del NO con el radical superóxido, ha hecho que el análisis del daño mediado por este metabolito sea un factor de suma relevancia para el conocimiento de la patogénesis de diversos procesos inflamatorios donde está involucrado el NO. En estos últimos años, desde Beckman<sup>138</sup> y colaboradores desarrollaron el método inmunohistoquímico para la detección de nitrotirosina como expresión del daño mediado por ONOO<sup>-</sup>, han sido muchos los estudios que han puesto de manifiesto que existe esta lesión en numerosos procesos inflamatorios principalmente de tipo crónico<sup>354</sup>. Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado un estudio del efecto de los peroxinitritos en un modelo de sepsis aguda. El análisis

inmunohistoquímico de nuestro experimento muestra que la sepsis es capaz de producir en un periodo de tan solo cuatro horas un incremento importante en el grado de tinción para la nitrotirosina en diversos tipos celulares del intestino.

El incremento en la nitración de tirosina en la sepsis era un fenómeno predecible, ya que los mediadores de inflamación cuya liberación es estimulada por endotoxina favorecen la formación del radical superóxido. También se ha especulado con la posibilidad de que la propia inducción de la iNOS en condiciones de bajo contenido celular de L-arginina sea capaz de producir  $O_2^-$ <sup>354</sup>. Estas fuentes de radical superóxido junto con la inducción de la síntesis de NO que tiene lugar en la sepsis (se comprueba en el incremento de RSNOs y nitratos y nitritos), hace que se formen  $ONOO^-$  y por lo tanto nitración de tirosina.

En el apartado de introducción se han comentado ampliamente las consecuencias del daño mediado por  $ONOO^-$ , éstas se engloban en dos fundamentales: lesión oxidativa tisular y depleción energética por activación de la PARS<sup>354</sup>.

#### ➔ **Intestino delgado.**

Hemos hallado incremento significativo de la expresión inmunohistoquímica de nitrotirosina en animales sépticos. Kennedy<sup>355</sup> ha comprobado que los peroxinitritos y no el NO son los responsables del incremento de permeabilidad transepitelial induciendo la ruptura de las cadenas de DNA que conllevan a la depleción de ATP. Si verdaderamente los  $ONOO^-$  alteran la permeabilidad intestinal, este hecho refleja que en los animales sépticos se está produciendo esta alteración. Estos efectos son coherentes con los cambios bioquímicos que hemos observado, ya que el incremento de la diferencia  $pCO_{2a} - pCO_{2i}$  revela una acidosis importante que a su vez es reflejo del descenso de flujo en la mucosa o bien de la disminución de la demanda crítica de oxígeno. Por otra parte, parámetros de tipo sistémico como la hiperlactatemia e hipertrigliceridemia, ponen de manifiesto que se está produciendo un importante gasto energético que causa daño celular.

### ➔ **Músculo liso vascular.**

La sepsis ha producido un intenso incremento de la inmunoreactividad a la nitrotirosina en el músculo liso de numerosas arterias. La disfunción endotelial y la alteración de la función del músculo liso, probablemente sean las características más relevantes de la sepsis en cuanto a sus consecuencias hemodinámicas<sup>338</sup>. Esta lesión parece estar mediada por ONOO<sup>-</sup> que causan inhibición de los movimientos de actina a través de la nitración de tirosina. Esta nitración de tirosina se ha evidenciado en nuestro modelo. Los ONOO<sup>-152</sup> causan vasodilatación por incremento de GMPc lo que contribuye a la hipotensión séptica. Además de estas alteraciones, los ONOO<sup>-</sup> causan también depleción energética en las células endoteliales contribuyendo a su disfunción. Nuestro trabajo apoya este hecho al comprobarse que existe relación entre el incremento de la expresión de nitrotirosina en el músculo liso vascular y el deterioro hemodinámico de los animales sépticos. El hallazgo de lesión mediada por ONOO<sup>-</sup> en un periodo de tiempo de cuatro horas, pone de manifiesto la importancia que cobra el stress nitrosativo en la patología séptica.

### ➔ **Pulmón.**

En la actualidad se desconocen los mecanismos y los factores que afectan a la actividad de moléculas como O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ONOO<sup>-</sup>, NO<sup>•</sup> y GSNO en respuesta a perturbaciones redox en el alvéolo pulmonar. El que la acción de una especie predomine sobre la otra parece depender del grado de producción que exista y del tipo celular donde actúen. Un trabajo realizado por Clerch sugiere que moléculas como O<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sup>•</sup> actúan como sensores químicos siendo éste uno de los componentes de las bases moleculares del reconocimiento redox<sup>356</sup>. Mientras la reacción de NO<sup>•</sup> con tioles parece relativamente favorable, el producto de su reacción con O<sub>2</sub><sup>-</sup> (ONOO<sup>-</sup>) es altamente reactivo. Stamler puso de manifiesto que el stress oxidativo está asociado con depleción de GSH sin que se produzca incremento de disulfuros, este hecho puede explicarse por la formación de GSNO que ha sido identificado en las vías aéreas. GSNO puede reaccionar con los tioles de las proteínas G transduciendo la una sobreexpresión de superóxido dismutasa (MnSOD) como mecanismo de defensa frente al stress oxidativo. Estos mecanismos propuestos por Clerch y Stamler hacen que la reserva de GSH en el alvéolo pulmonar

sea una pieza clave en la respuesta frente al stress oxidativo.

El hecho de que en nuestro modelo no hayamos observado tinción positiva en ninguno de los animales puede deberse a los mecanismos de defensa del pulmón frente al stress oxidativo, ya mencionados. Efectivamente, si el GSH presente en el pulmón reacciona con el NO que genera la sepsis formando GSNO, se impide la formación de peroxinitritos. La demostración de este hecho confiere al GSH un papel regulador del daño mediado por ONOO<sup>-</sup> en el pulmón, donde los peroxinitritos producen alteraciones en el surfactante pulmonar por oxidación<sup>152</sup>, lo que puede provocar alteraciones en el intercambio gaseoso pulmonar. Esta alteración en el intercambio gaseoso es evidente en nuestro modelo de sepsis donde existe daño pulmonar.

Además de la lesión oxidativa tisular y la depleción energética celular, la producción de peroxinitritos puede conllevar reacciones de nitrosación de proteínas estructurales y funcionales. Las consecuencias fisiopatológicas de la nitración de tirosina en la sepsis aún no están dilucidadas. Se ha relacionado la nitrosación de proteínas con el déficit de contractilidad<sup>152</sup> y se piensa que la nitración es capaz de originar la pérdida de funcionalidad proteica, incluso inhibición enzimática. Recientemente se está comenzando a manejar por parte de investigadores básicos el concepto de “stress nitrosativo”<sup>357</sup> aludiendo a al fenómeno de las consecuencias de un incremento en los procesos de nitración. Este concepto no se aplica aún en la práctica clínica, pero sin duda se extenderá próximamente, debido a que estas alteraciones bioquímicas tienen lugar en numerosas patologías de carácter inflamatorio y como ha demostrado nuestro experimento, también en el shock séptico.

Otra de las aportaciones de nuestro trabajo, es que pone de manifiesto que el daño mediado por ONOO<sup>-</sup>, evidenciado a través del incremento de nitrotirosina, sucede de una manera más precoz que la lesión isquémica tisular detectada por métodos histológicos convencionales. Este hecho puede tener relevancia en el diagnóstico de lesión orgánica en el enfermo séptico, ya que muestra que el epitelio intestinal, aunque no posea signos histológicos de isquemia, está sometido a un stress que posiblemente repercuta negativamente en su funcionalidad ya que los ONOO<sup>-</sup> entre otras acciones, alteran la permeabilidad intestinal<sup>355</sup>. Por lo tanto, en función de lo observado en nuestro modelo, la determinación inmunohistoquímica de nitrotirosina además de



ayudar a explicar la patología séptica, puede ser clínicamente útil ya que aporta información sobre una alteración que afecta a la funcionalidad orgánica no detectable por métodos histológicos convencionales.

Después del análisis de los resultados obtenidos en cuanto a fisiopatología de la sepsis; se puede afirmar que el modelo empleado, además de reproducir muchas de las alteraciones propias de la sepsis ya descritas con anterioridad, aporta datos de suma relevancia:

- El hallazgo de que el incremento  $p\text{CO}_{2i} - p\text{CO}_{2A}$  se comporte de modo diferente en función del segmento intestinal estudiado, puede atribuirse a que ambos presentan un grado de vascularización diferente.
- El hecho de que los **RSNOs**, se incrementen en un proceso de sepsis aguda implica dos importantes aspectos:
  - por su actividad vasoactiva probablemente estén contribuyendo al deterioro de la función vascular y además,
  - pueden ser utilizados como estimadores de la producción de **NO**.
- La sepsis aguda produce intensas lesiones mediadas por **ONOO<sup>-</sup>** lo que puede originar estrategias terapéuticas destinadas a paliar ese daño. Por otra parte, revela lesiones no detectables por las tinciones histológicas convencionales comúnmente aplicadas en las Unidades de Cuidados Intensivos.

## 2. EFECTOS DE LA HEMOGLOBINA

### A) ACCIONES SISTÉMICAS:

- *Acción sobre la presión arterial media*

Los efectos que produce la Hb en nuestro experimento sobre la PAM, tanto en animales no sépticos como en los animales sépticos, son comparables en su mayoría a los observados por otros investigadores, si bien nuestro trabajo revela efectos indeseables de la Hb no descritos hasta ahora.

Los primeros estudios realizados sobre la Hb como resucitador vascular en el shock endotóxico aportaban resultados favorables con respecto a otros resucitadores convencionales del shock como la albúmina<sup>285</sup>. Aranaow realizó un experimento en un modelo de sepsis porcina en el cual se administraba a uno de los grupos una infusión de Hb a los 30' del estímulo séptico. Se observó en un comienzo, que tanto el grupo que recibía Hb como el que recibía dextrano, experimentaban un descenso de la PAM, probablemente el producido por la sepsis. Posteriormente, a partir del minuto 90 el grupo que recibe Hb incrementa su PAM de un modo significativamente diferente a aquel que no, es decir atenuaba la hipotensión séptica de un modo más eficaz. Haciendo un análisis detallado de sus datos, se puede observar que después del minuto 180, el efecto resucitador no se diferencia al del grupo que recibe dextrano. Los autores hipotetizan que esta actividad puede estar relacionada, además de otros mecanismos, con la capacidad de la Hb para captar e inactivar NO. De acuerdo con los hallazgos observados en el experimento de Aranow no se puede concluir este supuesto ya que se observa un efecto hipertensor superior al del dextrano desde el minuto 90, momento en el que no puede asegurarse que esté inducida la producción de NO extraendotelial. Además, la Hb no parece presentar ventajas sobre el dextrano en los momentos en los que existe una hiperproducción de NO (aproximadamente a partir de los 180 minutos desde la inducción séptica). Por lo tanto, según los datos obtenidos por este grupo, la Hb no parece presentar ventajas reales sobre la solución de dextrano, como resucitador del shock, ya que en el intervalo de tiempo inicial donde se observa una cierta diferencia, en la práctica clínica en pocas ocasiones se comienza una intervención terapéutica a los 30'

de la inducción séptica, cuando aún no son evidentes las consecuencias hemodinámicas de la sepsis.

La administración de Hb en nuestro experimento se ha realizado una vez que las manifestaciones clínicas de disregulación vascular por hiperproducción de NO eran evidentes, lo que implica una situación clínica más real. Hemos observado efecto hipertensivo en el grupo séptico en el cual se recobran valores basales de PAM, no ejerciendo este efecto en los animales control (normotensos y con concentraciones de nitrosotioles, nitratos y nitritos inferiores a las del grupo séptico), donde el incremento que se produce es muy leve. Por lo tanto en nuestro experimento se ve reforzado el supuesto de que la Hb ejerce su efecto hipertensor captando NO ya que se compara el efecto que produce la Hb en un estado de “no sepsis” en el que no existe hiperproducción de NO, y en animales sépticos en los cuales su producción está incrementada generando hipotensión severa.

- *Acción sobre la PAP*

Uno de los efectos adversos de la Hb más relevante es el intenso incremento que provoca sobre la PAP. Otros autores han reportado también este efecto de la Hb; Bone<sup>358</sup> halló incrementos de la PAP (junto con incremento de la PAM, la RVS y descenso del IC) en un modelo en el cual una Hb modificada era administrada durante 24 horas. Este hecho implica que la Hb puede agudizar el fallo pulmonar que tiene lugar en la sepsis.

- *Efectos sobre el IC*

El descenso de IC producido por la Hb en nuestro experimento ha sido igualmente descrito en otros modelos similares al nuestro<sup>359</sup>, al igual que en voluntarios sanos<sup>360</sup>.

En vista de este perfil hemodinámico ( $\uparrow$ PAM,  $\uparrow$ PAP,  $\downarrow$ IC,  $\uparrow$ RVS) y el hecho de que la administración de Hb en pacientes con shock séptico conlleva como resultado la reducción de dosis de norepinefrina sin cambios en la PAM y PAP con descenso del IC y de la RVM<sup>358</sup>; se plantea la siguiente cuestión:

*¿Es mejor la Hb que los inhibidores de la NOS en el tratamiento del shock séptico?*. En un modelo de sepsis crónica inducido con endotoxina de *Salmonella typhi* observaron que la Hb conllevaba un descenso más leve del IC y un menor incremento de la RVS, aunque presentaba un efecto hipertensor inferior al de LNAME (L-nitroargininmetilester)<sup>361</sup>. Algunos autores han observado que el efecto vasopresor de la Hb va acompañado de evidencias indirectas de mejoría en la perfusión tisular en un modelo de shock hemorrágico comparado con los tratamientos resucitadores convencionales<sup>285</sup>. Por el contrario, como vamos a discutir a continuación, en nuestro modelo de sepsis la perfusión tisular parece empeorar.

## B) EFECTOS HEMODINÁMICOS REGIONALES

- *Acción sobre los flujos regionales*

El efecto sobre los flujos regionales fue hipotetizado por Aranaow<sup>362</sup> que propuso el déficit en la perfusión hepática como mecanismo para justificar el incremento que produce la Hb sobre parámetros bioquímicos como la bilirrubina y fosfatasa alcalina. Este supuesto no es plenamente demostrable a través de dichos parámetros, ya que por una parte la bilirrubina podría estar elevada como consecuencia de la metabolización de la Hb administrada; y por otra parte, los autores no especifican si han considerado que la Hb administrada, por lo tanto circulante y presente en plasma, produce interferencias analíticas en métodos espectrofotométricos (tanto en la determinación de BT, como en la fosfatasa alcalina), lo que puede dar lugar a valores artefactualmente alterados [por este motivo, en nuestro trabajo no han sido realizadas estas medidas, ya que la presencia de Hb en el suero produce interferencias en el método analítico empleado]<sup>363</sup>. Otros autores verificaban que el tratamiento con Hb producía un incremento tardío en la pCO<sub>2</sub> y un descenso pronunciado de la pO<sub>2</sub>, así como una acidosis importante, lo que sugiere que las anomalías en la perfusión han sido exacerbadas por la Hb<sup>CROWLEY,273</sup>. Estos argumentos hacían imprescindible la monitorización de flujos regionales para evaluar y verificar este posible efecto.

En un estudio posterior del autor Aranaow<sup>285</sup> se administran dosis bajas de hemoglobina (150 mg/kg) y se realizan medidas del flujo mesentérico y del flujo de la mucosa ileal. Aranaow y colaboradores no hallan diferencias significativas en el flujo

mesentérico para la dosis administrada. El trabajo de Aranaow reporta descensos de flujo en la mucosa ileal. Los autores sostienen que la Hb administrada a estas dosis puede ser terapéuticamente útil ya que no presenta el efecto indeseable del descenso de flujo a nivel mesentérico. Este supuesto lo reiteran en otro trabajo en el que no aprecian descenso del flujo renal, ni del flujo mesentérico<sup>285</sup>. Tampoco observan incrementos de la RVS. Por el contrario, en nuestro experimento se producen descensos importantes en el flujo de la arteria mesentérica incluso para una dosificación de 100 mg/kg en el caso de animales control. Este hecho pone de manifiesto que la Hb capta el NO producido por la eNOS, puesto que en el grupo control la iNOS no está expresada, lo que puede tener consecuencias perjudiciales sobre la regulación del flujo tisular. Nosotros observamos un importante incremento de la resistencia vascular sistémica, pero además observamos que este incremento de la resistencia vascular se produce también el lecho vascular esplácnico, donde la Hb acentúa el incremento que produce la sepsis en la resistencia vascular mesentérica estimada.

El efecto producido por la Hb sobre los flujos regionales podría compararse con el observado para otros inhibidores no selectivos de la NOS. Personas afectadas de shock séptico tratadas con L-NMMA recuperaban valores de PAM normales y mejoraban la resistencia vascular sistémica<sup>364,338</sup>, pero a pesar estos efectos hemodinámicos beneficiosos, existen pocos datos que avalen que estos agentes farmacológicos mejoren la función orgánica o la supervivencia, lo que probablemente implique que no tienen el mismo efecto beneficioso sobre lechos vasculares regionales.

Una aportación importante de nuestro estudio en lo referente a la acción de la Hb en los flujos regionales, es que se pone de manifiesto que el comportamiento de la Hb difiere en los animales sépticos con respecto a los controles en algunos aspectos. En los animales control, el descenso de flujo se produce a partir de la primera dosis administrada y sin embargo, en la sepsis este efecto es significativo a partir de dosis muy superiores. La explicación de este efecto puede hallarse en el hecho de que al estar los tejidos de los animales sépticos deficientemente irrigados, por lo tanto hipoxémicos, parte de la Hb administrada se transforma alostéricamente en su forma T produciendo liberación del NO<sup>365</sup> que se hallaba unido a los grupos -SH, lo que le confiere menor capacidad vasoconstrictora. Realmente, el comportamiento en los animales sépticos es como si, además de administrar Hb libre, estuviéramos aportando nitroso-Hb ya que el

NO producido por la sepsis rápidamente reacciona con la Hb. Probablemente por este motivo estamos observando un comportamiento diferente; Stamler comprobó que la nitroso-Hb presentaba un comportamiento vasoconstrictor igual que la Hb libre salvo en tejidos isquémicos, donde la nitroso-Hb no producía dicha vasoconstricción<sup>365</sup>. Es probable que esta sea la causa de que nosotros no observamos un efecto vasoconstrictor tan potente en lecho esplácnico de los animales sépticos donde la sepsis puede producir hipoxia en estos tejidos. Posiblemente, gran parte de la Hb circulante en dicho lecho vascular se encuentre en forma de nitrosoHb de tal forma que el efecto vasoconstrictor sea menor. De hecho, la Hb parece ejercer cierto efecto regulador en la redistribución de flujo en la sepsis, donde se observa que la Hb es capaz de mantener una distribución del flujo constante lo que confirma el papel regulador de la Hb en las acciones mediadas por el NO. Además, como puede observarse en la figura R37, la Hb parece incrementar la RVM de una forma más pronunciada en el grupo control que en el séptico, si bien esta diferencia no parece ser significativa. Esta hipótesis de que la Hb sea una molécula capaz de liberar NO en determinadas condiciones fisiológicas se ve reforzada por el hallazgo de que la Hb produce un incremento en la nitrotirosina en el intestino, lo que indirectamente implica lesión mediada por NO; es decir de alguna manera la Hb parece aportar NO a los tejidos. El hecho de que el efecto neto final sea vasoconstricción en ambos casos (sépticos y controles), concuerda con el efecto observado por Stamler de que ambos tipos de Hb, la libre y nitrosoHb poseen capacidad vasoconstrictora.

Todavía existen incógnitas en el mecanismo de acción de la Hb, ya que si se verifica que la hipoxia produce un cambio conformacional que implica la liberación de NO, ¿porqué el efecto neto de la Hb es siempre vasoconstricción a pesar de la liberación de NO en los tejidos?. Este hecho puede deberse a varias razones:

- La Hb en nuestro modelo era administrada de un modo constante y con una dosificación creciente, lo que hace posible que aunque parte de la Hb cambie de estado conformacional favoreciendo la donación de NO, probablemente una gran porcentaje no sufriera este cambio conformacional originando vasoconstricción mediante captación de NO. De esta forma se estaría produciendo de modo simultáneo los dos procesos: parte del NO es captado por la Hb que no sufre cambio conformacional y a la vez, la fracción de Hb que cambia de conformación libere NO.

- También es posible que aún cuando la Hb administrada sufra cambios conformacionales liberando NO de los grupos tiol; simultáneamente, el grupo hemo capte NO manteniendo así el efecto vasoconstrictor de la Hb.

Además de las consideraciones realizadas, el hipotético tratamiento clínico del paciente séptico mediante administración de Hb tendría lugar de un modo más prolongado que en el experimento. Esto supone un incremento paulatino de la concentración plasmática de Hb debido a su lenta eliminación renal, pudiendo originar los efectos indeseables sobre el flujo observados por nuestro grupo para dosis más elevadas. Por lo tanto, sería conveniente ajustar la dosis dependiendo de la función renal del paciente.

Después del hallazgo de Stamler sobre la regulación alostérica de la interacción Hb-NO, se ha especulado sobre la posibilidad de que la administración de SNO-Hb en vez de Hb libre solucionaría muchos de los inconvenientes de las soluciones de Hb. Esta hipótesis se basa en que la SNO-Hb produce vasoconstricción igual que la Hb salvo en tejidos isquémicos donde probablemente la SNO-Hb libere NO lo que implicaría mejora en la perfusión de tejidos isquémicos. Esta estrategia resucitadora no ha sido probada aún en la actualidad ni en el shock séptico ni en otros tipos de shock pero seguramente estudios posteriores revelarán si es adecuada o no.

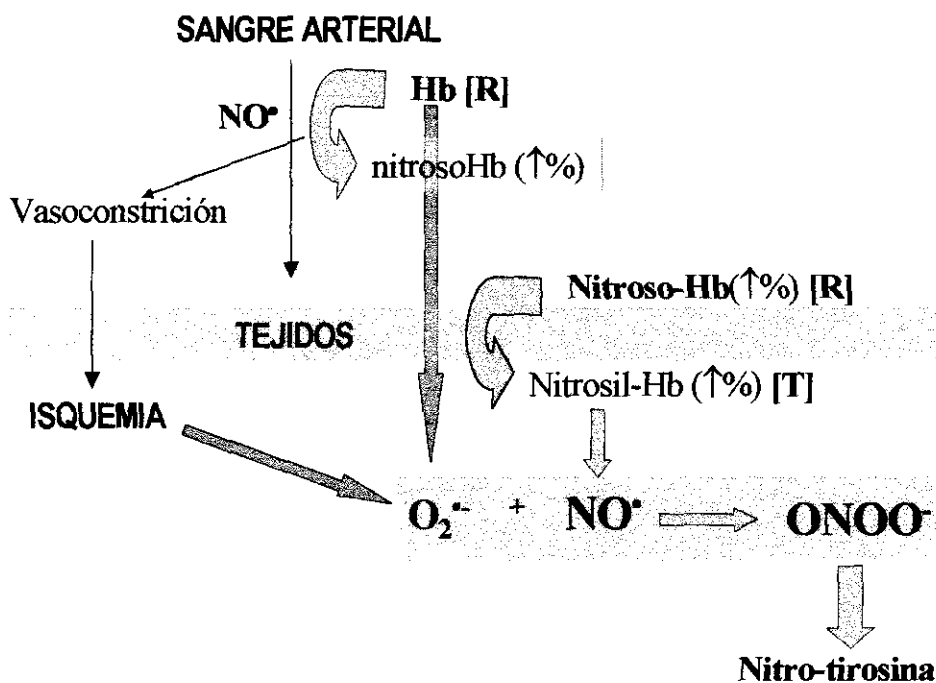
### C) **LA Hb PROVOCA LESIÓN por PEROXINITRITOS en ANIMALES CONTROL**

Un hallazgo inédito de nuestro experimento es que la Hb produce un incremento significativo de la formación de nitrotirosina en diversas localizaciones del tejido intestinal. Esta acción es aparentemente paradójica, ya que si la Hb principalmente actúa captando NO, lo esperable sería el efecto contrario: que la Hb disminuyera la lesión mediada por ONOO<sup>-</sup>, al igual que lo hacen inhibidores de la síntesis de NO. Sin embargo, la Hb no parece actuar así.

Nuestro grupo propone la siguiente hipótesis para explicar este hecho (Ver Figura D1). Como ya hemos visto anteriormente, la formación de ONOO<sup>-</sup> requiere la existencia de dos especies:

- $O_2^{\bullet -}$ :
  - Puede proceder de del propio proceso isquémico provocado por la Hb, ya que la hipoxia genera un importante gasto energético que conlleva consumo de  $O_2$  con formación de  $O_2^{\bullet -}$  <sup>366</sup>.
  - La administración de Hb parece generar radicales libres entre ellos  $O_2^{\bullet -}$ , el grupo hemo puede reducir el oxígeno molecular originando la formación de  $O_2^{\bullet -}$  <sup>367</sup>.
- $NO^{\bullet}$ : Según la hipótesis de regulación alostérica de la unión Hb-NO propuesta por Stamler, la Hb cuando llega a los tejido sufre un cambio conformacional (de R a T) que conlleva la liberación de  $NO^{\bullet}$ .

La presencia de estas dos especies conlleva la formación de  $ONOO^{\bullet}$ , lo que justifica la tinción de nitrotirosina hallada.



**Fig D1.- Mecanismo propuesto para justificar la formación de nitrotirosina en animales control tratados con Hb.** El  $O_2^{\bullet -}$  generarse en procesos de hipoxia y directamente de la Hb. El  $NO^{\bullet}$  puede ser liberado por la Hb a los tejidos según la regulación alostérica propuesta por Stamler.



Otra posibilidad es que el anión superóxido sea capaz de reaccionar con el óxido nítrico aun cuando éste se halle unido a la Hb por el grupo hemo originando la formación de ONOO<sup>-</sup>. Por otra parte, parece que el daño oxidativo mediado por peroxinitritos es dependiente de la ratio NO y superóxido; de tal forma que el exceso de NO parece reducir los procesos oxidativos inducidos por peroxinitritos<sup>368</sup>. En el grupo que recibe Hb probablemente se esté produciendo el fenómeno contrario: un exceso de especies reactivas de oxígeno debido a la isquemia frente a una pequeña proporción de NO. La Hb al producir hipoxia por vasoconstricción induce la formación de especies oxidantes y a la vez capta el NO circulante; esta relación inversa puede propiciar la lesión mediada por peroxinitritos.

Otro factor que sin duda repercute en la capacidad formadora de nitrotirosina de la Hb, es el hecho de que al administrar Hb de modo exógeno provocamos un desequilibrio en la proporción fisiológica de Hb-GSH. En estado fisiológico normal, la Hb dona NO en los tejidos<sup>253</sup>, que puede reaccionar con el GSH eritrocitario formando GSNO con actividad vasodilatadora favoreciendo la irrigación tisular. Además, el GSH es captador y neutralizador de peroxinitritos. Al existir GSH en el medio en condiciones basales, la formación de nitrotirosina es inapreciable como se observa en las muestras extraídas antes de la intervención quirúrgica. El desequilibrio en la proporción Hb-GSH, probablemente favorezca que los tejidos sean más susceptibles a la formación de nitrotirosina. La verificación de este supuesto corroboraría la influencia del stress oxidativo en las acciones del óxido nítrico en el shock séptico.

Sin embargo, estos mecanismos no explican todos los efectos observados. En nuestro modelo, la Hb mejora el daño mediado por ONOO<sup>-</sup> en la sepsis lo que se justificaría bajo la hipótesis de que la Hb actuara captando NO del medio e impidiendo que éste reaccionara con otras especies. Esto se contrapone al efecto observado en el grupo control, lo que indica que aún existen muchos factores desconocidos que pueden influir en el efecto de la Hb sobre la lesión mediada por ONOO<sup>-</sup>.

Una vez analizadas estas cuestiones, podemos hacer las siguientes consideraciones:

#### **LA HB COMO RESUCITADOR DEL SHOCK:**

- Los aspectos hemodinámicos sistémicos podrían avalar cierta acción hemodinámica beneficiosa ( $\uparrow$ PAM,  $\uparrow$ RVS y  $\downarrow$ IC). Sin embargo, produce un importante incremento de la PAP.
- Según lo observado en nuestro modelo, la Hb empeora considerablemente los flujos del lecho esplácnico.
- La Hb produce daño mediado por ONOO<sup>-</sup> lo que implica una importante lesión oxidativa que puede comprometer la funcionalidad de ciertas proteínas y por lo tanto originar lesión en determinados órganos.

#### **EN CUANTO AL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA HB:**

- Nuestros datos confirman que el efecto vasoconstrictor de la Hb se debe fundamentalmente a su capacidad de interaccionar con el NO.
- La formación de nitrotirosina causada por la Hb, revela que de algún modo la Hb libera NO o permite que éste reaccione con otras especies. Este hecho apoya la tesis de Stamler de que la Hb ejerce un papel regulador sobre la distribución de NO y no se comporta como mero captador de éste.

### 3. EFECTOS VASCULARES del GSH

#### A) El GSH y las reacciones de transnitrosación con Hb.

El GSH ha sido administrado en nuestro experimento con la finalidad de demostrar interacción entre el GSH y la Hb como molécula clave en la modulación de la fisiología del NO. Los resultados obtenidos, detallados previamente, pueden sintetizarse en lo siguiente:

- ➔ Incremento de los flujos de la arteria mesentérica y vena porta superando incluso la reducción de flujo producida por la Hb administrada.
- ➔ Aumento leve del flujo de arteria mesentérica y vena porta en animales sépticos.
- ➔ Reducción notable de la resistencia vascular mesentérica que estaba incrementada en los animales tratados con Hb (tanto controles, como sépticos) y en animales sépticos sin tratamiento.

El análisis global de la acción del glutatión muestra que éste revierte los efectos vasculares de la Hb sobre la circulación regional, no ejerciendo ningún efecto aparente sobre su actividad sistémica para la dosificación de un bolo de 1g. Esta reversión de los efectos de la Hb pone de manifiesto que el glutatión es una molécula capaz de competir con la Hb por el NO presumiblemente a través de un equilibrio competitivo entre los grupos tiol de las cisteínas de la Hb y el GSH, dando lugar a la formación de GSNO. Sin embargo, el hecho de que este efecto se manifieste solamente a nivel regional no parece tener una justificación clara *a priori*. Con los datos que se conocen en la actualidad acerca de la bioquímica del óxido nítrico, se pueden proponer fundamentalmente dos mecanismos para justificar esta regionalidad:

#### 1.- “Sitios diana” para los RSNOs de BPM.

El GSNO es un RSNOs de BPM que posee los efectos vasculares propios de moléculas de su grupo (vasodilatación, disminución de la resistencia vascular...). En cuanto a las bases moleculares del mecanismo de acción de este tipo de moléculas, existen indicios de la existencia de receptores específicos “sitios diana” para los RSNOs a través de los cuales pueden ejercer su actividad. Trabajos realizados *in vitro* por

Mathews<sup>230</sup> revelan que el efecto vasodilatador de los RSNOs no está relacionado con su estabilidad química lo que apunta a la existencia de una interacción específica con un receptor. Estos autores postulan que existen múltiples “sitios diana” distribuidos de forma heterogénea de tal modo que es posible que existan RSNOs que posean afinidad por un determinado órgano o tejido diana donde se ejerza su acción a través de estos receptores. Un trabajo realizado por Davison<sup>369</sup> sugiere que existen “sitios” estereoselectivos de reconocimiento de RSNOs puesto que se observan diferentes efectos hemodinámicos para los estereoisómeros L y D de S-nitrosocisteína. Estos autores proponen que las acciones biológicas de los RSNOs pueden implicar la transnitrosación de aminoácidos plasmáticos y de proteínas que componen las membranas celulares. Según estos resultados obtenidos parece evidenciarse que los receptores de nitrosotioles asociados a membrana pueden existir en el sistema cardiovascular y el arco baroreflejo. Estos hallazgos corroboran otros estudios realizados por el mismo grupo en los que hallaban que el isómero L del compuesto S-nitroso-β-β-dimetilcisteína tiene un poder vasodilatador muy superior al mostrado por el isómero D<sup>370</sup>. Los resultados obtenidos en nuestro experimento corresponden con los que cabría esperar bajo esta hipótesis, ya que la reversibilidad del efecto de la Hb a través de la formación de GSNO ha se ha demostrado con un efecto vasodilatador en el lecho vascular esplácnico. A pesar de este efecto, no se puede afirmar a partir de estos datos que exista selectividad orgánica del GSNO, ya que el efecto regional observado puede verse modificado por múltiples factores como la dosis administrada, la pO<sub>2</sub>, el grado de disfunción endotelial del vaso considerado etc.

*La existencia de receptores específicos para los RSNOs está aún por demostrar, en la actualidad no ha sido identificado ninguno de ellos. La confirmación de esta “selectividad de lecho vascular” para diferentes RSNOs sería de extraordinaria relevancia en la patología séptica donde existe alteración en la distribución del volumen circulante como se ha verificado en nuestro modelo de shock. Esta disregulación implica que existan órganos deficientemente irrigados lo que indudablemente conlleva a alteraciones metabólicas a nivel celular que conducen al desarrollo del fallo multiorgánico. La posibilidad de que existan sustancias capaces de mantener el flujo en tejidos especialmente sensibles a la isquemia como el intestino sin potenciar el efecto hipotensor sistémico (como hemos visto en los efectos del GSH) hace que determinados RSNOs tengan un importante potencial como terapia que descienda el*

daño orgánico por isquemia.

## 2.- Influencia del gradiente fisiológico de oxígeno

Otra posible hipótesis es que la interacción del GSH con la Hb sea dependiente de la conformación de ésta y del grado de oxigenación de cada tejido.

El aporte de oxígeno a los tejidos es función del contenido sanguíneo de oxígeno y del flujo<sup>371</sup>. El contenido de oxígeno es ampliamente dependiente de la Hb que sufre transiciones alostéricas en el pulmón y en la microcirculación que promueven el ligamiento y la liberación de O<sub>2</sub><sup>372</sup>. El flujo regional está regulado por los requerimientos metabólicos tisulares: el flujo se incrementa por hipoxia y desciende cuando el aporte de oxígeno supera la demanda<sup>373</sup>. Se piensa que estas respuestas fisiológicas clásicas están parcialmente mediadas por cambios en los niveles de NO endotelial. Este planteamiento clásico presenta algunos problemas. Primero, no está claro porqué el oxígeno se pierde al torrente sanguíneo antes de alcanzar los tejidos<sup>374</sup> y segundo, los hematíes parecen oponer su propio O<sub>2</sub> a la función de aporte ya que específicamente la Hb reduce el flujo sanguíneo y aborta la vasodilatación hipóxica secuestrando NO en las arteriolas terminales<sup>375</sup>.

El reciente hallazgo realizado por Stamler sobre la regulación alostérica de la interacción del NO con la Hb ha supuesto una revolución de enorme trascendencia en el conocimiento de la fisiología del óxido nítrico. Según la regulación expuesta por Stamler, la transición alostérica de la Hb de la configuración R (oxiHb) a T (deoxiHb) controla la reactividad de los grupos cisteína  $\beta$ 93 que pueden reaccionar con NO o RSNO<sup>253</sup>. Estos autores proponen que el NO puede ser liberado de los grupos tiol en condiciones de bajo pO<sub>2</sub>, basándose en que la afinidad por RSNO es elevada para la estructura R y baja para la estructura T. Estudios previos realizados con Hb y SNO-Hb, predominantemente en su conformación R, mostraban que ambos producían contracción de los vasos<sup>229</sup>, ya que en ambos casos la Hb era capaz de secuestrar el NO también en el grupo hemo inactivando su acción. Sin embargo, en tejidos hipóxicos, este estado favorecía la transformación a la estructura T y el efecto que se observaba era que la Hb producía vasoconstricción mientras que la nitrosohemoglobina no. Esta dependencia del estado de oxigenación en la capacidad de la SNO-Hb para liberar NO en estados de

baja oxigenación podrían explicar el porqué nosotros solo hemos observado que el GSH era capaz de revertir los efectos de la Hb a nivel regional.

La Hb administrada era fundamentalmente del tipo R (oxigenada puesto que su manipulación se realizaba en condiciones ambientales 21% O<sub>2</sub>). En este estado, los grupos tiol de los residuos de cisteína de la Hb no se hallan, según lo expuesto por Stamler, accesibles al contacto con el disolvente, de tal forma que es poco probable que en este estado el GSH sea capaz de revertir los efectos vasoconstrictores de la Hb ya que no es posible que tengan lugar reacciones de transnitrosación para formar GSNO. Sin embargo, en el lecho vascular esplácnico, donde la Hb había producido un importante descenso del flujo y la hipoxia generada era grave, el GSH sí es capaz de producir relajación contrarrestando por completo la acción de la Hb. En las condiciones que presentaba el lecho vascular esplácnico en ese momento, parece obvio que la conformación de la Hb cambiara a T, de tal forma que los grupos -SNO estarían en la superficie externa de la Hb permitiendo la liberación de NO y las reacciones de transnitrosación con el GSH. Esta relación con la pO<sub>2</sub> la ha verificado Stamler a través del siguiente método: el GSH potencia los efectos de la SNO-Hb de una forma inversamente proporcional a la pO<sub>2</sub>. Nosotros hemos observado que el GSH revierte las acciones de la Hb también de un modo inversamente proporcional a la pO<sub>2</sub>, lo cual corrobora el mismo concepto de Stamler por otro método diferente.

El GSH actúa revirtiendo los efectos de la Hb en el flujo de la arteria mesentérica y vena porta; incluso el incremento de flujo en los animales sépticos es superior al correspondiente en ese periodo a los animales que no recibían Hb. Este hecho indica que el GSH además de interaccionar con la Hb, es posible que actúe a través de reacciones de transnitrosación con otros RSNOs como la nitrosoalbúmina, si bien estas interacciones parecen ser minoritarias. De hecho en los animales sépticos, donde existe un incremento de los RSNOs, se observa un leve incremento de flujo con la administración de GSH lo que posiblemente tenga lugar a través de estas reacciones.

Los resultados obtenidos por nuestro grupo son concordantes con los mecanismos propuestos por Stamler y aportan la confirmación de que estas reacciones están implicadas en una patología concreta como es el shock séptico y en un lecho vascular como el esplácnico. Por lo tanto, parece confirmarse que la SNO-Hb es capaz

de “sensar” la  $pO_2$  tisular y entonces utiliza la transición alostérica para controlar el tono vascular. Sin embargo, si el aporte de oxígeno excede la demanda, SNO-Hb retiene el grupo NO manteniendo la estructura R con el efecto neto de reducir el flujo concordando con la demanda. Por lo tanto, la SNO-Hb contribuye a la respuesta clásica fisiológica de vasodilatación hipóxica y vasoconstricción hiperóxica.

Parece evidenciarse por lo tanto la influencia del gradiente de oxígeno y los cambios conformacionales de la Hb en las interacciones Hb-NO. En otro estudio realizado por Gow<sup>259</sup> se muestra además, que dichos cambios conformacionales dependientes del gradiente de oxígeno, están influenciados por el ratio NO:Hb. Gow comprobó que al someter una solución de deoxihemoglobina, donde el ratio NO:Hb era similar al fisiológico (1:100), a un burbujeo continuo de aire, una fracción significativa de Hb(FeII)NO era transformada a SNO-Hb. Es decir, aproximadamente el 70-80% del NO unido al grupo hemo, se unía a los grupos tiol. Sin embargo, cuando el ratio NO:Hb se incrementaba a 1:1, la formación de SNO descendía a cero. Una vez que la concentración de NO excedía dos veces la de la Hb, de nuevo volvía a formarse SNO-Hb alcanzando un máximo del 4% del NO añadido. En nuestras condiciones experimentales, la proporción es claramente inferior a la fisiológica, ya que al administrar Hb a dosis muy elevadas, estamos forzando una proporción NO:Hb <1:100, incluso en los animales sépticos. Si se cumple *in vivo* el hecho de que una baja proporción NO:Hb conlleva un mayor porcentaje de NO unido a grupos tiol, en nuestro experimento cabría esperar un porcentaje muy elevado de dichos enlaces SNO. Efectivamente, nosotros observamos que el GSH revierte completamente la acción vasoconstrictora de la Hb lo que revela que en nuestro caso, el NO que está unido a la Hb se halla en los grupos tiol.

No hay que olvidar por último, que la técnica empleada para medir el gasto cardiaco conlleva un cierto tiempo (se realiza por triplicado y se calcula la media), lo que puede implicar una infraestimación de los efectos sistémicos del GSH ya que no permite apreciar cambios que tienen lugar de modo muy transitorio. A pesar de ello, la PAM sí era medida de forma instantánea y sus cambios eran registrados a tiempo real; no presentando cambios significativos.

## B) Efecto del glutatión en animales no tratados con Hb

Los resultados expuestos muestran que el GSH administrado por vía venosa en animales no tratados previamente con Hb, provoca acciones diferentes dependiendo de que sean animales sépticos o no. En el grupo no séptico, el GSH no producía ninguna acción, ni a nivel sistémico ni regional. En cambio en los animales sépticos, el GSH produce un leve incremento del flujo de la región esplácnica incrementándose los flujos de la arteria mesentérica y de la vena porta. Las hipótesis que nuestro grupo propone para justificar este hecho están de nuevo basadas en la existencia de reacciones de transnitrosación:

1. En los animales sépticos el NO generado, además de hallarse en forma de nitratos y nitritos vascularmente inactivos, también se halla en forma de RSNOs, fundamentalmente en forma de nitrosoalbúmina y NO libre. El incremento de grupos tiol circulantes hace que se produzcan reacciones de transnitrosación que originan la formación de RSNOs de bajo peso molecular con actividad vasoactiva. El GSH puede reaccionar con la nitrosoalbúmina y otros RSNOs formando GSNO con actividad vasoactiva.
2. Otro mecanismo por el cual el GSH puede desempeñar esa acción es por su capacidad como “captador y destructor” de peroxinitritos, especie química que como ya se ha comentado previamente causa disfunción endotelial y vascular. Esta disfunción endotelial mediada por los peroxinitritos de muestra en el hecho de que los peroxinitritos reducen la habilidad de las células para movilizar el  $\text{Ca}^{++}$  en respuesta a vasodilatadores dependientes de endotelio. Probablemente la inhibición de las vasorelajaciones dependientes de endotelio sean secundarios a los procesos tóxicos mediados por los  $\text{ONOO}^-$  tales como la inhibición de pasos metabólicos, movilización del calcio, alteraciones de las señales celulares y activación de la PARS. Cuzocrea y colaboradores han demostrado directamente que el GSH ejerce un papel protector frente a los cambios vasculares inducidos por  $\text{ONOO}^-$ , ya que éste mejoraba la respuesta a acetilcolina en animales que recibían peroxinitritos. Puesto que la captación celular de GSH es limitada, parece que la neutralización extracelular de peroxinitritos es el mecanismo que contribuye al efecto protector



observado<sup>377</sup>.

3. Estudios *in vitro* revelan<sup>365</sup> que el GSH potencia la vasorelajación inducida por SNO-Hb. Es posible que el incremento de formación de NO en la sepsis aumente las concentraciones de SNO-Hb y se observe una potenciación de vasodilatación en la sepsis comparada con una situación control.
4. El GSH potencia la acción vasorelajante de la SNO-Hb de una manera más efectiva en condiciones de hipoxia, porque se favorece la conformación T que permite la transferencia de NO. En la sepsis, donde la pO<sub>2</sub> local tisular probablemente se halle más baja que en condiciones de normalidad, la liberación de NO por el cambio conformacional de la Hb puede estar potenciado haciendo que éste sea más accesible para interaccionar con el GSH.

La disregulación de la distribución de flujo en la sepsis, además de producir hipoxia tisular sobre los tejidos, genera frecuentemente fenómenos de reperfusión cuando los tejidos afectados por la hipoxia recuperan la vascularización, provocando lesiones tisulares aún más graves que las de la hipoxia. Este mecanismo de lesión tisular es el que ha llevado a muchos autores a contemplar la posibilidad de administrar donadores de NO en determinados órganos, especialmente el tejido hepático, debido a que el NO combate el efecto lesivo de muchos de los radicales libres generados en la reperfusión y regula el tono vascular de los vasos que irrigan dichos órganos. El mismo razonamiento podría aplicarse al efecto regional observado en nuestro experimento ya que presumiblemente la acción del GSH a nivel regional en la sepsis, se deba a la formación de GSNO, cuyo efecto vascular es comparable con el del NO aunque más prolongado que éste, de tal forma que mejoraría el daño en órganos deficientemente irrigados y por lo tanto sujetos a daño por fenómenos de isquemia-reperfusión. De acuerdo con los resultados obtenidos, el glutatión podría tener efectos beneficiosos en el proceso séptico por varios efectos:

- El GSH es capaz de incrementar el flujo de órganos deficientemente vascularizados en animales sépticos, presumiblemente mediante la formación de GSNO, sin potenciar el efecto hipotensor sistémico en la dosis estudiada. El GSH, como se ha visto en los resultados aportados, atenúa el incremento de la resistencia vascular

esplácica atribuible a la sepsis.

- El GSH al ser una molécula con potencial reductor puede aminorar los efectos oxidantes mediados por radicales libres y otras sustancias oxidantes que se liberan por el stress oxidativo que genera la sepsis.
- Puede evitar el daño que produce el NO por formación de peroxinitritos en muchos tejidos, incluido el endotelio, debido a que el GSH se comporta como un captador de NO y ONOO<sup>-</sup>.

Estos hipotéticos efectos benéficos del GSH esbozados a partir de los resultados observados en nuestro experimento serán testados en próximos estudios en los que se valorará específicamente la actividad de esta molécula.

A través del empleo de L-butionina-(S,R)-sulfoxamina (BSO), un inhibidor específico de  $\gamma$ -glutamilcisteinasintetasa (enzima responsable del mantenimiento de la síntesis de cisteína y que por lo tanto evita la depleción de grupos tiol), algunos autores habían propuesto el posible papel del GSH endógeno como molécula protectora contra el shock, especialmente con relación al daño multiorgánico<sup>378,379,380,381,382,119,383</sup>. Sin embargo no hay resultados claros porque el BSO parecía exacerbar el daño por isquemia reperusión en algunos modelos experimentales<sup>384,385</sup> y no en otros<sup>386</sup>. Estos trabajos ponen de manifiesto la relevancia del GSH como molécula protectora en varios órganos, pero no hacen referencia a la función que puede desempeñar como modulador de la función vascular en el shock séptico. Recientemente otro grupo de investigadores ha propuesto, al igual que nosotros, un posible efecto beneficioso del GSH para mejorar el daño vascular generado por endotoxina<sup>354</sup>. Estos autores han testado el efecto de BSO, sobre el fallo vascular inducido por peroxinitritos y shock endotóxico. Los resultados obtenidos fueron que el BSO incrementa los efectos inducidos por los peroxinitritos: supresión de la respiración mitocondrial, la formación de nitrotirosina, la oxidación proteica, el daño en el DNA y la activación de la PARS. Sin embargo, el GSH y un ester derivado, atenuaban estos efectos. Además, el GSH mejoraba el empeoramiento de la respuesta contráctil a noradrenalina mediado por peroxinitritos, al igual que las relajaciones dependientes de endotelio como la respuesta a acetilcolina. Tanto la repercusión del BSO, como el efecto protector del GSH parecen indicar que la

presencia de grupos tiol, de alguna manera ejerce un efecto protector sobre las lesiones mediadas por peroxinitritos.

## **Relevancia fisiológica de las reacciones de transnitrosación:**

### **Expectativas de futuro**

La confirmación de la existencia de reacciones de transnitrosación relacionadas con en el metabolismo del NO puede tener repercusiones importantes en su actividad biológica ya que la nitrosación de residuos de cisteína supone la pérdida de funcionalidad de numerosas proteínas. Desde hace tiempo es conocido que la presencia de grupos tiol *in vitro* previene la pérdida de funcionalidad de un gran número de proteínas ya que permite el mantenimiento de los residuos de cisteína reducidos esenciales para desarrollar su actividad. A lo largo de la historia se han realizado intensos estudios de tipo genético, enzimático y químico que han dilucidado el papel de los grupos tiol en la funcionalidad proteica en cuanto a efectos catalíticos, mantenimiento de la estructura cuaternaria, señales de transducción y expresión génica.

Más recientemente se ha revelado el papel de estos grupos en cuanto a la respuesta de su interacción con el NO y el O<sub>2</sub>. Becker y colaboradores<sup>387</sup> han demostrado que se produce este tipo de interacciones en el enzima glutation reductasa. Han comprobado que al ser expuesto este enzima a GSNO o al complejo dinitrosil-diglutationil-hierro, el enzima era inactivado. Becker y colaboradores demuestran que el sitio activo ditiol participa en una serie de oxidaciones y señalan que el posible compuesto intermediario son los S-nitrosotioles. Este es un ejemplo de reacciones de transnitrosación comparable al demostrado por nuestro grupo con la Hb donde hemos podido comprobar que la presencia de grupos -SH del glutation hace que se reviertan algunas de sus acciones.

Los estados inflamatorios se caracterizan por un estado de stress nitrosativo generado por la existencia de una concentración de sustancias nitrosantes por encima del umbral tolerable<sup>388</sup>. En estados de importante stress nitrosativo se producen excesivo número de nitrosaciones, modificaciones covalentes de centros nucleofílicos: cisteínas que generalmente resisten la reacción, núcleos aromáticos y aminas susceptibles al

ataque. Estos sistemas pueden ser concomitantemente susceptibles al stress oxidativo, esto se ve reflejado en el hecho de que se produce oxidación de grupos tiol a elevadas concentraciones de sustancias nitrosantes<sup>389</sup>. En la actualidad, se desconocen aún qué proteínas y en qué grado puede estar afectada su funcionalidad en patologías como la sepsis. Sin duda, las consecuencias del stress nitrosativo y el modo de combatirlo será objeto de numerosos estudios en los próximos años. Existen ya predicciones basadas en un modelo con compuestos ditiol<sup>236</sup> que sugiere que la existencia de tioles próximos, evita los ataques nitrosativos mediados por NO (S-nitrosilación forman compuestos inestables ya que se acelera la formación de disulfuros con pérdida del grupo NO). Esta hipótesis coincide con el mecanismo que nosotros proponemos para explicar los posibles efectos benéficos que puede mostrar el GSH ya que éste puede provocar reacciones de transnitrosación generando GSNO, molécula inestable cuyo metabolismo origina fundamentalmente GSSG<sup>357</sup>.

Las posibilidades que puede originar este tipo de señal biológica y la relevancia de las modificaciones en la estructura y funcionalidad de las proteínas son amplísimas. Sin duda, se abre un campo que permitirá realizar modificaciones con relevancia terapéutica, especialmente en patologías como el shock séptico en la que el óxido nítrico juega un papel fundamental como mediador.

## ***CONCLUSIONES***

- 1.- En condiciones de sepsis, aumenta la formación de nitrosotioles.
- 2.- La concentración plasmática de nitrosotioles está en relación con la gravedad de la sepsis.
- 3.- La formación de peroxinitritos, originados mediante la reacción del radical superóxido y NO, da lugar a daño celular en la sepsis, como se ha demostrado mediante la detección de nitrotirosina en muestras de tejido de animales sépticos.
- 4.- La administración de hemoglobina se asocia con un efecto presor en la sepsis.
- 5.- La administración de hemoglobina se asocia con una disminución del daño mediado por ONOO<sup>-</sup> en la sepsis, como lo demuestra la presencia de menores cantidades de nitrotirosina en animales sépticos tratados con hemoglobina que en aquellos que no reciben este tratamiento.
- 6.- El glutatión produce vasodilatación en la sepsis, apoyando el concepto de la existencia de reacciones de transnitrosación entre nitrosotioles circulantes y/o la interacción del glutatión con el NO libre.
- 7.- La administración de glutatión revierte el efecto vasoconstrictor de la hemoglobina sugiriendo la presencia de reacciones de transnitrosación in vivo.
- 8.- La interacción demostrada entre la hemoglobina y el glutatión sugiere que el efecto captador de NO por la hemoglobina sucede en estas condiciones experimentales fundamentalmente en los grupos -SH de los residuos de cisteína, y no, como generalmente se acepta, en el grupo hemo.
- 9.- Puesto que el hematíe es rico en glutatión, la interacción entre la hemoglobina y el glutatión ayuda a explicar además, la ausencia de efecto vasoconstrictor de la hemoglobina intraeritrocitaria.

# ***BIBLIOGRAFÍA***

1. Baue AE. Multiple Organ Failure : Patient Care and Prevention. St. Louis : Mosby, 1990 : 339-363.
2. Goris RJA : Sepsis and multiple organ failure : The results of whole body inflammation. In Faist E, Meakins J, Schildberg FW (eds) : Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis. Berlin-Heidelberg : Springer-Verlag, 1993 : 161-170.
3. Bone RC. The sepsis syndrome. Clinics in Chest Medicine. 1996; 17(2):175-181.
4. Nathens AB, Marshall JC. Sepsis, SIRS, and MODS: What's in a name?. World J Surg. 1996; 20: 386-391.
5. Goris RJA. MODS/SIRS: Result of an Overwhelming Inflammatory Response?. World J Surg. 1996; 20:418-421.
6. Marshall J, Sweeney D : Microbial infection and the septic response in critical surgical illness. Arch Surg 1990 ; 125 :17-23.
7. Baue AE : The horror autotoxicus and multiple-organ failure. Arch Surg 1992 ; 127 : 1451-1462.
8. Deitch EA. Multiple Organ Failure : Pathophysiology and potential future therapy. Ann Surg 1992 ; 216 : 117-134.
9. Friese RS, Wollmering M, Moore EE, Ketch LL, Banerjee A, Harken AH. Trauma primes cells : editorial review. Shock 1994 ; 1 : 388-394.
10. Baue AE. Multiple, progressive or sequential systems failure. A syndrome of the 1970's. Arch Surg 1975 ; 110 : 779-781.
11. McLean LD, Mulligan WG, McLean APH, Duff JH. Patterns of septic shock in man : a detailed study of 56 patients. Ann Surg 1967 ; 166 : 543-562.
12. Skillman JJ, Bushell LS, Goldman H, Silen W. Respiratory failure, hypotension, sepsis, and jaundice. A clinical syndrome associated with lethal haemorrhage from acute stress ulceration of the stomach. Am J Surg 1969; 117 : 523-530.
13. Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP. Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms : an unsolved problem in postoperative care. Ann Surg 1973 ; 115 : 136-140.
14. Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL, Polk HC. Multiple system organ failure. The role of occult infection. Arch Surg 1980;115:136-140.
15. Meakins JL, Wicklund B, Forse RA, McLean APH. The surgical intensive care unit: Current concepts in infection. Surg Clin North Am 1980;60:117-132.
16. Bell RC, Coalson JJ, Smith JD, Johanson WG. Multiple organ system failure and infection in adult respiratory distress syndrome. Ann Intern Med 1983;99:293-298.
17. Faist E , Baue AE, Dittmer H, Heberer G. Multiple organ failure in polytrauma patients. J Trauma 1983; 23 : 775-781.
18. Marshall JC, Christou NW, Horn H, Meakins JL. The microbiology of multiple organ failure. The proximal GI tract as an occult reservoir of pathogens. Arch Surg 1988 ; 123 : 309-315.
19. Norton LW. Does drainage of intra-abdominal pus reverse multiple organ failure? Am J Surg 1985;149:347-350.
20. Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. N Eng J Med 1987;316:379-85.
21. Dinarello CA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. J Infect Dis 1991;163:1177-1184.



22. Sculier JP, Bron D, Verboven N, Klasterky J. Multiple organ failure during interleukin-2 and LAK cells infusion. *Intensive Care Med* 1988;14:666-667.
23. Anderson BO, Bensard DD, Harken AH. The role of platelet activating factor and its antagonists in shock, sepsis, and multiple organ failure. *Surg Gynecol Obstet* 1991;172:415-424.
24. Ayala A, Chaudry IH. Immune dysfunction in murine polymicrobial sepsis : mediators, macrophages, lymphocytes and apoptosis. *Shock*. 1996 ; 6 : S27-S38.
25. Gilbert RP. Mechanisms of the hemodynamic effects of endotoxin. *Physiol Rev* 1960; 40: 245-279.
26. Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock in humans: Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113: 227-242.
27. Lorente JA, Renes MA, Gómez-Aguinaga MA, Landín L, Liste D. Oxygen delivery-dependent oxygen consumption in acute respiratory failure. *Crit Care Med* 1991; 19: 770-777.
28. Sibbald WJ, Fox G, Martin C. Abnormalities of vascular reactivity in the sepsis syndrome. *Chest* 1991;100:S155-9.
29. Siegel JH, Greenspan M, Del Guercio LRM. Abnormal vascular tone, defective oxygen transport, and myocardial failure in human septic shock. *Ann Surg* 1967;165:504-517.
30. Groenveld ABJ, Nauta JJP, Thijs LG. Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock. *Surgery* 1987;99:140-52.
31. Renes E, Lorente JA, Landín L, Gómez-Aguinaga MA, de Pablo R, Fernández-Alvaro P. Influence of the DO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub> relationship on survival in patients with ARDS. *Chest* 1992;102:S133.
32. Pomerantz K, Casey L, Fletcher JR, Ramwqell PW. Vascular reactivity in endotoxin shock: effect of lidocaine or indomethacin pretreatment. *Adv Shock Res* 1982;7:191-194.
33. Fink MP, Homer LD, Fletcher JR. Dimished pressor response to exogenous norepinephrine and angiotensin II in septic, in anaesthetised rats: evidence for a prostaglandin-mediated effect. *J Surg Res* 1985;38:335-42.
34. McKenna TM, Titius WAW. Role of monokines in altering receptor and non-receptor mediated vascular contraction in sepsis. In *Molecular and cellular mechanisms of septic shock*. B Roth, T Nielsen, and A McKee, eds. Alan R Liss Inc, New York, 1989, pp. 279-303.
35. Ognibene, FP, Parker MM, Burch-Whitman C, Natanson C, Shelhamer JH, Schlesinger T, et al. Neutrophil aggregating activity and septic shock in humans. *J Crit Care* 1988;3:103-11.
36. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock: association between Interleukin-6, Interleukin-1, and fatal outcome. *J Exp Med* 1989;169:333-38.
37. Carcillo JA, Litten RZ, Suba EA, Roth BL. Alterations in rat aortic alpha-1 adrenoceptors and alpha-1 adrenergic stimulated phosphoinositide hydrolysis in intraperitoneal sepsis. *Circ Shock* 1988;26:331-39.
38. McMillan M, Chernow B, Roth BL. Hepatic alpha-1 adrenergic receptor alteration in a rat model of chronic sepsis. *Circ Shock* 1986;19:185-93.
39. Chiu A, Chambers DE, Lin CC, Kuehl WD, Palmer MJ. Effects of inhibition of nitric oxide formation on basal vasomotion and endothelium-dependent responses of the coronary arteries in awake dogs. *J Clin Invest* 1991;87:1964-68.

40. McKenna TM. Prolonged exposure of rat aorta to low levels of endotoxin in vitro results in impaired contractility. *J Clin Invest* 1990;86:160-8.
41. Wylam ME, Samsel RW, Umans JG, Mitchell RW, Leff AR, Shumacker PT. Endotoxin in vivo impairs endothelium-dependent relaxation of canine arteries in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:1263-67.
42. Lorente JA, Landín L, de Pablo R, Renes E, Jorge P, Liste D. L-arginine improves endothelium-mediated vasodilation in sepsis. *Chest* 1992c;S102.
43. Julou-Schaeffer G, Gray GA, Fleming I, Schott CC, Parratt JR, Stoclet JC. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *Am J Physiol* 1990;259:H1038-43.
44. Beasley D, Cohen RA, Levinski NG. Endotoxin inhibits contraction of vascular smooth muscle in vitro. *Am J Physiol* 1990a;258:H1187-92.
45. Robert R, Chapelain B, Jean T, Neliat G. Interleukin-1 impairs both vascular contraction and relaxation in rabbit isolated aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:733-739.
46. Morel DR, Lacroix JS, Hensen A, Steinig DA, Pittet JF, Lundberg JF. Increased plasma and lymph levels of endothelin during endotoxin shock. *Eur J Pharmacol* 1989;167:427-28.
47. DeMarchie M, Langleben D, Laporta D, Spanier A, Stewart D. Increased circulating plasma levels of endothelin-1 in the human adult respiratory distress syndrome and acute respiratory failure. *Chest* 1992;102:156S.
48. Albelda SM, Elias JA, Levine EM, Kern JA. Endotoxin stimulates platelet-derived growth factor production from cultured human pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol* 1989;257:L65-70.
49. Hinshaw LB. Sepsis/septic shock: Participation of the microcirculation: An abbreviated review. *Crit Care* 1996; 24: 1072-1078.
50. Hardaway RM. Trauma, sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care Med* 1995; 10:145-152.
51. Todd JC III, Mollet L. Sepsis-induced alterations in the erythrocyte membrane. *Am Surg* 1994; 60: 954-957.
52. Bellary S, Arden WW, Schwartz RW et al. Effect of lipopolysaccharide, leukocytes and monoclonal anti-lipid A antibodies on erythrocyte membrane elastance. *Shock* 1995; 3:132-136.
53. Thomas L. The physiological disturbances produced by endotoxins. *Annu Rev Physiol* 1954; 16:467-490. **(interés histórico)**.
54. Hinshaw LB, Emerson TE Jr. Circulatory shock. En: *Pathophysiology of the Microcirculation*. Mortillaro NA, Taylor AE (Eds). Ann Arbor, CRC Press, 1994, pp 87-104.
55. Lam C, Tymi K, Martin C. Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. *J Clin Invest* 1994;94:2077-2083.
56. Siegel LM, Grinspoon SK, Garvery GJ et al. Sepsis and adrenal function. *Trends in Endocrinological Metabolism* 1994; 5:324-328.
57. Donald DE. Splanchnic circulation. In: Shepherd JT, Abboud FM, eds. *Handbook of physiology: The cardiovascular system, peripheral circulation and organ blood flow*. New York: Raven Press, 1983: 219-40.
58. Parks DA, Jacobson DE. Physiology of the splanchnic circulation. *Arch Intern Med* 1985; 145:1278-81.

59. Haglund U. Systemic mediators released from the gut in critical illness. *Crit Care Med* 1993; 21: S15-8.
60. Reilly PM, Bulkley GB. Vasoactive mediators and splanchnic perfusion. *Crit Care Med* 1993; 21:S55-68.
61. Salzman AL. Nitric oxide in the gut. *Crit Care Med* 1993;21:S55-68.
62. Vallet B, Curtis SE, Lund N, Cain SM, Ann F. Intestinal mucosa injury during experimental endotoxin-induced shock. *Anesth Reanim* 1994; 13 (5):675-84.
63. Vincent JL, Van der Linden P. Septic shock: particular type of acute circulatory failure. *Crit Care Med* 1990; 18: S70-S74.
64. Renes E, Lorente JA, Gómez-Aguinaga MA, Landín L, Rodríguez R, Liste D. Alteraciones en la extracción hística de oxígeno en pacientes con insuficiencia respiratoria aguda. *Med Clin* 1991;96:85-91.
65. Powers SR, Mannal R, Neclerio M, et al. Physiologic consequences of positive end-expiratory pressure (PEEP) ventilation. *Ann Surg* 1973;178:265-272.
66. Danek SJ, Lynch JP, Weg JG, et al. The dependence of oxygen uptake on oxygen delivery in the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1980;122:387.
67. Rashkin MC, Davist. Acute complications endotracheal, intubation. Relationship to reintubation, route, urgency and duration. *Chest* 1986; 89(2):165-7.
68. Gutierrez G, Lund N, Bryan-Brown CW. Cellular oxygen utilization during multiple organ failure. *Crit Care Clin* 1989;5:271-288.
69. Pinski MR, Matuschak GM. A unifying hypothesis of multiple systems organ failure: failure of host defense homeostasis. *J Crit Care* 1990;5:108-114.
70. Lorente JA, Landín L, Renes E, et al. Role of nitric oxide in the hemodynamic changes of sepsis. *Crit Care Med* 1993;21:759-767<sup>a</sup>.
71. Landín L, Lorente JA, Renes E, de Pablo R, Jorge P, Ródenas E, Liste D. Effects of noradrenaline on oxygen transport variables in canine sepsis. *Med Intensiva* 1993c;17:S41.
72. Hotchkiss RS, Karl IE. Reevaluation of the Role cellular Hypoxia and Bioenergetic Failure in Sepsis. *JAMA*. 1992; 267 N°11: 1503-1510.
73. Romanosky AJ, Bagby GJ, Bockman EL et al. Increased muscle glucose uptake and lactate release after endotoxin administration. *Am J Physiol* .1980, 239: E311-E316.
74. Kreisberg RA. Pathogenesis and management of lactic acidosis. *Annu Rev Med*. 1984; 144: 579-585.
75. Beilman GJ, Cerra FB. The Future: Monitoring Cellular Energetics. *Critical Care Clinics*. 1996; 12 (4): 1031-1042.
76. Cerra FB. Hypermetabolism, organ failure, and metabolic support. *Surgery*.1987; 101: 1-14.
77. Mizock B. Septic shock: a metabolic perspective. *Arch Intern Med*.1984; 144:579-585.
78. Vary TC, Siegel JH, Nakatani T, et al. Effect of sepsis on activity of PDH complex in skeletal muscle and liver. *Am J Physiol*. 1986, 250: E634-E640.
79. Kilpatrick Smith L, Erecinska M. Celular effects of endotoxin in vitro.I.Effect of endotoxin on mitochondrial substrate metabolism and intracelular calcium. *Circ Shock*. 1983 ,11:85-99.

80. Vary-TC. Sepsis-induced alterations in pyruvate dehydrogenase complex activity in rat skeletal muscle: effects on plasma lactate. *Shock*. 1996 Aug; 6(2): 89-94.
81. Vary TC, Siegel JH, Tall BD, et al. Metabolic effect of partial reversal of pyruvate dehydrogenase activity by dichloroacetate in sepsis. *Circ Shock*. 1988, 24: 3-38.
82. Garber AJ, Karl IE, Kipnis DM. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1976; 251: 836-843.
83. James-JH; Fang-CH; Schrantz-SJ; Hasselgren-PO; Paul-RJ; Fischer-JE. Linkage of aerobic glycolysis to sodium-potassium transport in rat skeletal muscle. Implications for increased muscle lactate production in sepsis. *J-Clin-Invest*. 1996 Nov 15; 98(10): 2388-97.
84. Gibson WH, Cook JJ, Gatipon G and Moses ME. Effect of endotoxin shock on skeletal muscle cell membrane potential. *Surgery*. 1977; 81:571-577.
85. Trunkey DD, Illner H, Wagner IY and Shires GT. The Effect of septic shock on skeletal muscle action potentials in the primate. *Surgery* . 1979; 85:638-643.
86. Illner HP and Shires GT. Membrane defect and energy status of rabbit skeletal muscle cells in sepsis an septic shock. *Ann Surg*. 1981; 116:1302-1305.
87. Liaw KY, Askanzi J, Michelson CB, Kantrowitz LR, Fürst P, Kime JM. Effect of injury and sepsis of high-energy phosphates in muscle and red cells. *J Trauma* 1980; 80(9): 755-9.
88. O'Brien WJ, Lingrel JB, Fischer JE, Hasselgren PO. Sepsis increases skeletal muscle sodium, potassium-adenosinetriphosphatase activity without affecting messenger RNA or protein levels. *J-Am-Coll-Surg*. 1996; 183(5):471-479.
89. Erecinska MF, Dagani D, Nelson JD and Siver JA. Relations between intracellular ions and energy metabolism: a study with monensin in synaptosomes, neurons and C6 glioma cells. *J Neurosci*. 1991; 11: 2410-2421.
90. Pellerin L and Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91:10625-10629.
91. Burns HJG, Cowan BN, Ledingham I. Metabolic acidosis in the critical ill. *Ciba Found Symp*. 1982; 87: 293-306.
92. Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem-Biophys-Res-Commun*. 1995; 211(2):375-81.
93. Mohr S, Stamler JS, Brüne B. Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-fosfatodeshidrogenasa at its site active site thiol by nitric oxide, peroxyxynitrite and related nitrosating agents. *FEBS Lett*. 1994; 348:223-227.
94. Mohr S, Stamler JS, Brüne B. Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-fosfato deshidrogenasa by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. *J Biol Chem*. 1996; 271(8):4209-14.
95. Fagan JM, Ganguly M, Tiao G, Fischer JE, Hasselgren P-O. Sepsis increases oxidatively damaged proteins in skeletal muscle. *Arch Surg*. 1996; 131: 1326-1332.
96. Shaw JHF, Koea JB. Metabolic basis for the management of the septic surgical patient. *World J Surg* 1993; 17:154.

97. Clark MA, Hentzen BTH, Planck LD and Hill GL. Sequential Changes in insulin-like growth factor 1, plasma proteins, and totalbody protein in severe sepsis and multiple injury. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 1996; 20(5): 363-370.
98. Samra JS, Summers LKM, and Frayn. Sepsis and fat metabolism. *British Journal of Surgery* 1996; 83:1186-1196.
99. Wolfe RR, Shaw JH. Glucose and FFA kinetics in sepsis. *Am J Physiol* 1985;248> E236-43.
100. Clutter WE, Bier DM, Shah SD, Cryer PE. Epinephrine plasma metabolic clearance rate and physiologic thresholds for metabolic and hemodynamic actions in man. *J Clin Invest* 1980;66:94-101.
101. Kurpad A, Khan K, Calder AG et al. Effect of noradrenaline on glycerol turnover and lipolysis in the whole body and subcutaneous adipose tissue in humans in vivo. *Clin Sci* 1994; 86: 177-84.
102. Divertie GD, Jensen MD, Miles JM. Stimulation of lipolysis in humans by physiological hypercortisolemia. *Diabetes* 1991;40:1228-32.
103. Simonsen L, Bulow J, Madsen J, Christensen NJ. Thermogenic response to epinephrine in the forearm and abdominal subcutaneous adipose tissue. *Am J Physiol* 1992; 263:E850-5.
104. Beylot M, Chassard D, Chambrier C et al. Metabolic effects of a D-beta-hydroxybutrate infusion in septic patients> inhibition of lypolysis and glucose production but not leucine oxidation. *Crit Care of Med* 1994; 22:1091-8.
105. Kovach AGB, Rosell S, Sandor P, Koltay E, Tomka N. Blood flow, oxygen consumption, and free fatty acid release in subcutaneous adipose tissue during hemorrhagic shock in control and pheoxybenzamine-treated dogs. *Cirs Res* 1970; 26:733-41.
106. Issekutz B Jr, Shaw WAS, Issekutz TB. Effect of lactate on FFA and glycerol turnover in resting and exercising dogs. *J Appl Physiol* 1975; 39: 349-53.
107. Cabana VG, Siegel JN, Sabesin SM. Effects of the acute phase response on the concentrrration and distribution of plasma lipids and apolipoproteins. *J Lipid Res* 1989; 30: 39-49.
108. Van Lenten BJ, Fogelman AM, Haberland ME, Edwards PA. The role of lipoproteins and receptor mediated endocytosis in the trrrnsport of bbacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acccad Sci USA* 1986; 83:2704-8.
109. Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Rapp JH. Human very low density lipoprotteins and chilomicrons can protect againts endotoxin-induced death in mice. *J Clin Invest* 1990; 86:696-702.
110. Fiddian-Green RG, Pittenger G, Whitehouse WM. Back-diffusion of CO<sub>2</sub> and its influence on the intramural pH in gastric mucosa. *J Surg Res*. 1982; 33: 39-48.
111. Grum CM, Fiddian-Green RG, Pittenger GL, et al. Adequacy of tissue oxygenation in intact dog intestine. *J Appl Physiol*. 1984; 56:1065-1069.
112. Cunningham JA, Cousar CD, Jaffin JH, Harmon JW. Extraluminal and intraluminal PCO<sub>2</sub> levels in the isquemic intestines of rats. *Curr Surg*. 1987; 44: 229-232.
113. Antonsson JB, Boyle CC, Kruthoff KL, et al. Validation of tonometric measurement of gut intramural pH during endotoxemia and mesenteric occlusion in pigs. *Am J Physiol*. 1990; 44: 229-232.
114. Russell JA. Gastric tonometry: does it work?. *Intensive care Med* 1997; 23: 3-6.

115. Wei MH, Rackow EC, Trevino RP, Grundler W, Falk JL, Griffel MI. Difference in acid-base state between venous and arterial blood during cardiopulmonary resuscitation. *N Engl J Med* 1986; 315:153-156. (interés histórico).
116. Grundler W, Weil MH, Rackow RC. Arteriovenous carbon dioxide and pH during cardiac arrest. *Circulation* 1986; 74:1071-1074.
117. Ruokonen E, Takala J, Kari A, Saxen H, Mertsola J, Hansen E. Regional flow and oxygen transport in septic shock. *Crit Care Med* 1992; 21:1296-1303.
118. Schlichtig R, Bowles SA. Decreasing intestinal interstitial pH reflects metabolic acidosis during flow stagnation. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: A792.
119. Zang H, Vicent JL. Arteriovenous differences in pCO<sub>2</sub> and pH are good indicators of critical hypoperfusion. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:867-871.
120. Schlichtig R, Bowles SA. Distinguishing between aerobic and anaerobic appearance of dissolved CO<sub>2</sub> in intestine during low flow. *J Appl Physiol* 1994; 76: 2443-2451.
121. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (London)*. 1980; 288:373-376.
122. Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid activable factor from retractor penis is organic nitrite and the endothelium derived relaxing factor is nitric oxide. En: Vanhoutte PM, editor. *Vasodilation: Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium*. Nueva York: Raven Press 1988; 401-414.
123. Ignarro LJ, Byrne RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. En: Vanhoutte PM, editor. *Vasodilation: Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium*. Nueva York: Raven Press 1988; 427-466.
124. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide physiology pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
125. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327:49-66.
126. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 258:1898-1902.
127. Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res*. 1983; 35:524-573.
128. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992; 258:1898-1902.
129. Nagase S, Takemura K, Ueda A, Hirayama A, Aoyagi K, Kondoh M, Koyama A. A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine. *Biochemical and biophysical research communications* 1997; 233: 150-153.
130. Stamler JS, Lipton S and Sigel DS. NO comments. *Nature*. 1994; 367:28.
131. Ignarro LJ. Biological properties and actions of endothelium-derived relaxing factor released from artery and vein. *Circ Res*. 1989; 65: 1-21.
132. Stadler J, Bergonia HA, Disilvio M et al. Non-heme iron-nitrosyl complex formation in rat hepatocytes: detection by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch Biochem Biophys*. 1993; 302:4-11.

133. Gaston B, Reilly J, Drazen JM, Fackler J, Ramdev P, Arnette D, Mullins ME, Sugarbaker DJ, Chee C, Singel DJ, Loscalzo J, Stamler JS. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:10961.
134. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 1993; 364: 626-632.
135. Rachmilewitz D, Stamler JS, Rarmeli F et al. Peroxynitrite-induced rat colitis - a new model of colonic inflammation. *Gastroenterology*. 1993; 105: 1681-1688.
136. Wu M, Pritchard KA, Kaminski PM et al. Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. *Am J Physiol*. 1994; 266 (Heart Circ. Physiol.35): H2108-13.
137. Moro MA, Darley-Usmar VM, Goodwin DA et al. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:6702-6.
138. Beckman JS, Ye Y-B, Anderson PG et al. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hopper-Seyler*. 1994; 375:81-88.
139. Kelm M, Yosida K. Metabolic fate of nitric oxide and related N-oxides. En: "Methods in Nitric Oxide research". Edited by Feelisch M and Stamler JS. 1996; Cap 5: 47-58.
140. Davies MG, Fulton GJ and Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *British Journal of Surgery*. 1995; 82:1598-1910.
141. Schlag G and Redl H. Mediators of injury/inflammation. *World J Surg*. 1996; 20(4):406-410.
142. Yoshikawa T. Oxygen radicals in endotoxin shock. *Methods Enzymol*. 1990; 186:660-665.
143. Rubanyi GM, Ho EH, Cantor EH, Lumma WC, Parker Botelho LH. Cytoprotective function of nitric oxide: inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181:1392-97.
144. Wink DA, Hanbauer I, Krishna C, Degraff W, Gamson J, Mitchell JB. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:9813-9817.
145. Stamler JS. Redox Signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994; 78: 931-936.
146. Novelli GP, Angiolini P, Livi P et al. Oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of experimental shock. *Resuscitation*. 1989; 18:195-205.
147. Redl H, Gasser H, Schlag G et al. Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. *Brit Med Bull*. 1993; 49:556-565.
148. Taylor DE, Piantadosi CA. Oxidative metabolism in sepsis and sepsis syndrome. *Journal of Critical Care*. 1995; 10(3):122-135.
149. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271(40): C1424-1437.
150. Castro L, Rodriguez M, Radi R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem* 1994;269:29409-15.
151. Hausladen A, Fridovich Y. Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, nitric oxide does not. *J Biol Chem* 1994; 269:29405-08.

152. Szabó C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 1996;6(2): 79-88.
153. Radi R, Rodriguez M, Castro L, et al. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*. 1994; 308:89-95.
154. Inci A and Paul Kubes. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiology* 1996; 33: G225-G237.
155. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PM and Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production from peroxynitrite: implications for endothelial injury by nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-24.
156. Crow JP, Spruell C, Chen J, Gunn C, Ischiropoulos H, Tasai M, Smith CD, Radi R, Koppenol WH, Beckman JS. On the pH-dependent yield of hydroxyl radical products from peroxynitrite. *Free Radical Biol Med*. 1994;16:331-38.
157. Zhu L, Gunn C, Beckman JS. Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298:452-57.
158. Ischiropoulos H, Zhu L, chen J, Tsai HM, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298:431-437.
159. Sampson JB, Rosen H, Beckman JS. Peroxynitrite dependent tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase, myeloperoxidase and horseradish peroxidase. *Methods Enzymol* 1996; 269:210-218.
160. Beckman JS, Ischiropoulos H, Zhu L, et al: Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*. 1992; 298:438-445.
161. Chabot F, Mitchell JA, Quinlan GJ, Evans TW. Characterization of the vasodilator properties of peroxynitrite on rat pulmonary artery: role of poly (adenosine 5'-diphosphoribose) synthase. *British Journal of Pharmacology* 1997; 121:485-490.
162. Haddad IY, Pataki G, Hu-P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 1994; 94(6): 2407-13.
163. Kooy NW, Stephen JL, James AR, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: Evidence for the presence of peroxynitrite. *Crit Care Med* 1997; 25(5): 812-819.
164. Kaszaki J, Wolfard A, Bari F, Boros M, Parrat JR, Nagy S. Effect of nitric oxide synthase inhibition on myocardial contractility in anesthetized normal and endotoxemic dogs. *Shock* 1996; 6(4):279-285.
165. Chantler PD, Gratzer WB. Effects of specific chemical modification of actin. *Eur J Biochem* 1975; 60:67-72.
166. Szabó C, Cuzzocrea S, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. Endothelial Dysfunction in a rat model of endotoxic shock. *J Clin Invest* 1997; 100:723-735.
167. Molina Y, Vedia L, McDonald B, et al. Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. *J Biol Chem*. 1992; 267:24929-32.
168. Van der Vliet A, O'Neil CA, Halliwell B, et al. Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite. *FEBS* 1994; 339:89-92 (letter).
169. McCabe W, Treadwell T and DeMaria A. Pathophysiology of bacteremia. *Am J Med*. 1983;Special issue:7-18.



170. Parratt JR, Stoclet JC, Furman BL. Substances mainly derived from vascular endothelium-derived relaxing factor, or nitric oxide and endothelin as chemical mediators in sepsis and endotoxaemia. *Y Handbook of Mediators of Septic Shock*. Neugebauer E, Holaday JW, editors. CRC Press, Boca Raton, FL, 1993 pp: 381-393.
171. Salvemini D, Korb R, Anggard E, Vane J. Immediate release of nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by E coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;2593-98.
172. Rees DD, Celtek S, Palmer RMJ, Moncada S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone. An insight into endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:541-7.
173. Beasley D, Schwartz JH, Brenner BM. Interleukin-1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1991;87:602-608.
174. Kilbourn RG, Jubran A, Gross SS, et al. Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172:1132-8.
175. Kilbourn RG, Gross SS, Jubran A, Adams A, Griffith OW, Levi R, Lodato RF. N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: Implications for the involvement of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;8:3639-32.
176. Thiemeermann C, Vane J. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur J Pharmacol* 1990;182:591-5.
177. Szabó C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *En New Horizons : The science and practice of acute medicine* 1995; 3(1):2-32.
178. Parker JL, Adams HR. Selective inhibition of endothelium-dependent vasodilator capacity by *Escherichia coli* endotoxemia. *Circ Res* 1993; 72: 539-551.
179. Gryglewski RJ, Botting R, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension* 1988; 12:530-548.
180. Lefer AM, Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 33:71-90.
181. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis. Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to E coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7738-42.
182. Nathan CF, Stuehr DJ. Does endothelium-derived nitric oxide have a role in cytokine-induced hypotension? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:726-28.
183. McCall TB, Feelisch M, Palmer RMJ, Moncada S. Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. *Br J Pharmacol* 1991;102:234-238.
184. Estrada C, Gomez C, Martin C, Moncada S, Gonzalez C. Nitric oxide mediates tumor necrosis factor-a cytotoxicity in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1992;186:475-82.
185. Girardin E, Grau GE, Dayer JM, Roux-Lombard P, The J5 study group. Tumor necrosis factor and interleukin 1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Engl J Med* 1988;319:397-400.
186. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988;141:2407-2412.

187. Hollenberg SM, Cunnion RE, Parrillo JE. The effect of tumor necrosis factor on vascular smooth muscle. *Chest* 1991;100:1133-1137.
188. Julou-Schaeffer G, Fleming I, Parratt JR, Stoclet JC. The effect of inhibitors of the L-arginine/nitric oxide pathway on endotoxin-induced loss of vascular responsiveness in anesthetized rats. *J Pharmacol* 1991;103:1218-24.
189. Gonzalez C, Fernandez A, Martin C, Moncada S, Estrada C. Nitric oxide from endothelium and smooth muscle modulates responses to sympathetic nerve stimulation: implications for endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;86:15-156.
190. Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D. Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelial-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;237:529-38.
191. Zingarelli B, Salzman AL, Szabó C. Protective effects of nicotinamide against nitric oxide-mediated delayed vascular failure in endotoxic shock: potential involvement of polyADP ribosyl synthetase. *Shock* 1996; 5(4): 258-64.
192. Villa LM, Salas E, Darley-Usmar E, Radomski MV, Moncada S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:12383-87.
193. Kanwar S, Wallace JL, Befus D, Kubes P. Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. *Am J Physiol*. 1994; 266: G222-G229.
194. Kubes P. Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. *Am J Physiol*. 1992; 264: G1138-G1142.
195. Miller MJS, Sadowska-Krowicka H, Chotinaruemol S, Kakkis JL and Clark DA. Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 264:11-16.
196. Hutcheson IR, Whittle BJR and Boughton-Smith NK. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Br J Pharmacol*. 1990;101: 815-820.
197. Boughton-Smith NK, Evans SM, Laszlo F, Whittle BJR, and Moncada S. The induction of nitric oxide synthase and intestinal vascular permeability of endotoxin in the rat. *Br J Pharmacol*. 1993; 110: 1189-1195.
198. Avontuur JA, Bruining HA and Ince C. Inhibition of nitric oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxemic rats. *Circ Res*. 1995; 76:418-425.
199. Westberg G, Shultz PJ, Raji L. Exogenous nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis in rats. *Kidney Int*. 1994; 46: 711-716.
200. Unno N, Wang H, Menconi MJ, Tygat S.H.A.J, Larkin V, Smith M, Morin MJ, Chavez A, Hodin RA, Fink MP. Inhibition of inducible nitric oxide Synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* 1997;113:1246-1257.
201. Harbrecht BG, Stadler J, Demetris AJ, Simmons RL, Billiar TR. Nitric Oxide and prostaglandins interact to prevent hepatic damage during murine endotoxemia. *Am J Physiol* 1994; 266:G1004-G1010.
202. Kuo P, Slivka A, Loscalzo J. Nitric oxide decreases oxidant mediated hepatocyte injury. *J Surg Res* 1994; 56:594-600.
203. Nishida J, McCuskey RS, McDonnell D, Fox ES. Protective role of NO in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia. *Am J Physiol* 1994;267:G1135-1141.

204. Vos TA, Gouw ASH, Klok PA, Havinga R, van Goor H, Huitema S, Roelofsen H, Kuipers F, Jansen PLM, Moshage H. Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors on endotoxin-induced liver damage in rats. *Gastroenterology* 1997;113:1323-33.
205. Royall JA, Kooy NW, Beckman JS. Nitric oxide-related oxidants in acute lung injury. In "New Horizons" by the society of Critical Care Medicine. Vol 3 (1): 113-120.
206. Billiar TR, Harbrech BG. *Gastroenterology* 1997; 113(4): 1405-7.
207. Greenberg SG, Wilcox DE, Rubanyi GM. Endothelium-derived relaxing factor released from canine femoral artery by acetylcholine cannot be identified as free nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Circ Res.* 1990; 67:1446-1452.
208. Buga GM, Gold ME, Wood KS, Chaudhuri G and Ignarro JL. Endothelium-derived nitric oxide relaxes nonvascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1989; 161:61-72.
209. Shikano K, Long CJ, Ohlstein EH and Berkowitz BA. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide. *J Pharm Exp Ther.* 1988; 247: 873-881.
210. Kelm M and Schrader. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res.* 1990; 66:1561-1575.
211. Myers PR, Minor RL, Guerra R, Bates JN, Harrison DG. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature (London)* 1990; 345: 161-63.
212. Oae, S. and Shinhama, K. Organic thionitrites and related substances. A review. *Organic Prep. and Procedures.* 1983; 15:165-198.
213. Incze K, Farkas J, Milhalys V and Zukal E. Antibacterial effect of cysteine-nitrosothiol and possible precursors thereof. *Appl. Microbiol* 1974; 27: 202-5.
214. Ignarro L J, Lippston H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ and Gruetter CA. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exper Ther.* 1981; 218: 739-49.
215. Slivka A, Chuttani R, Carr-Locke DL, Kobzik L, Bredt DS, Loscalzo J, Stamler JS. Inhibition of sphincter of Oddi function by the nitric oxide carrier S-nitroso-N-acetylcysteine in rabbits and human. *The Journal of Clinical Investigation.* 1994; 94:1792-1798.
216. Jansen A, Drazen J, Osborne JA, Brown R, Loscalzo J and Stamler JS. The relaxant properties in guinea pig airways of S-nitrosothiols. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 1992; 263:285-92.
217. Ignarro LJ, Lippston H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PL & Gruetter CA. *J Pharmac Exp.* 1981; 218: 739-749.
218. Loscalzo J, Smick D, Andon N and Cooke J. S-nitrosocaptopril, molecular characterization and effects on the vasculature and on platelets. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 1989; 249: 726-29.
219. Mendelsohn ME, Oneil S, George D, and Loscalzo J. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J Biol Chem* 1990; 265: 19028-34.
220. Ignarro LJ, & Gruetter CA. *Biochim. Biophys.* 1980; Acta 631: 221-231.
221. Stamler JS, Loscalzo J. The antithrombotic effects of organic nitrates. *Trends Cardiovasc Med.* 1991; 1: 346-53.

222. Stamler JS, Jarki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valery CR, Loscalzo J. Nitric Oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:7674-7677.
223. Keaney JF, Simon DI, Stamler JS, Jaraki O, Scharfstein J, Vita JA, Loscalzo J. NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties. *J Clin Invest*. 1993; 91:1582-1589.
224. Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Hoffmann KH, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in normal humans. *Circulation*. 1994; 89:2035-2040.
225. Gaston B, Drazen JM, Jansen A et al. Relaxation of human bronchial smooth muscle by S-nitrosothiols in vitro. *J Pharmacol. Exp. Ther*. 1994; 268:978-984.
226. Abramson SB, Pizlak-Leszczynska J, Yegudin J et al. EDRFS (Nitric oxide, S-nitrosothiols) augment human neutrophil chemotaxis while inhibiting superoxide anion generation: role of intracellular S-nitrosothiol formation. *Endothelium*. 1993; 1:S29.
227. Stamler JS. S-nitrosothiols and bioregulatory reactions of nitrogen oxides with thiol groups. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995; 196:19-36.
228. Rockett KA, Auburn MM, Cowden WB and Clark IA. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immun*. 1991; 59(9): 3280-3283.
229. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jarki O, Michel T, Singel DJ & Loscalzo J. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. 1992. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:444-448.
230. Mathews WR and Kerr SW. Biological activity of nitrosothiols: the role of nitric oxide. *J. Pharmacol. Exper. Ther*. 1993; 267 No.3:1529-1537.
231. Rubanyi GM, Johns A, Wilcox D, Bates FN, Harrison D. Evidence that S-nitrosothiol, but not nitric oxide, may be identical with endothelium-derived relaxing factor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17(3suppl): 41S-45S.
232. Thomas G, Skinska VA and Lucas FV. The influence of glutathione and other thiols on human platelet aggregation. *Thrombosis Research*. 1986; 44:859-866.
233. Stamler JS, Feelisch M. Preparation and detection of S-nitrosothiols. En "Methods in nitric oxide research". Editado por Stamler JS, Feelisch M. 1996; 36: 521-539.
234. Ramdev P, Loscalzo J, Feelisch M and Stamler JS. Biochemical properties and bioactivity of a physiologic NO reservoir. *Circulation*. 1993; 88,Y522 (Abstrad).
235. Ignarro LJ. Nitric oxide, a novel signal transduction mechanism for transcelular communication. *Hypertension*. 1990; 16:477-483.
236. Arnelle DR and Stamler JS. NO<sup>+</sup>, NO<sup>•</sup>, and NO<sup>-</sup> donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1995; 318:279-285.
237. Feelish M and Stamler JS. Donors of Nitrogen Oxides. En: "Methods in Nitric Oxide Research". Edited by Stamler JS and Feelish cap 7: 71-115.
238. Scharstein JS, Keaney J, Stamler JS et al. Low molecular weight thiols transfer nitric oxide from an endogenous plasma reservoir to vascular smooth muscle. *Clin Res*. 1993; 41:232A.
239. Morris SL, Walsh RC and Hansen JN. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *J Biol Chem*. 1984; 259:13590-4.

240. Kowaluk E and Fung H-L. Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for in vitro vascular relaxation by S-nitrosothiols. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 1990; 255:1256-1264.
241. Scorza G, Pietraforte D, Minetti M. Role of ascorbate and protein thiols in the release of nitric oxide from S-nitroso-albumina and S-nitrosoglutathione in human plasma. *Free Radical Biology & Medicine* 1997; 22 (4):633-642.
242. Furchgott RF, Jothianandan D, Khan MT. Comparison of nitric oxide, S-nitrosocysteina and EDRF as relaxants of rabbit aorta. *Jpn J Pharmacol.* 1992; 58:185P-191P.
243. Wei EP, Kontos HA. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and endothelium-dependent cerebral arteriolar dilation. *Hypertension.* 1990; 16:162-169.
244. Stamler JS, Mendelsohn ME, Amarante P, Smick D, Andon N, Davis PF, Cooke JP, and Loscalzo J. N-acetylcysteine potentiates platelet inhibition by endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res.* 1989; 65:789-795.
245. Cooke JP, Stamler JS, Andon N, Davies PF and Loscalzo J. Flow stimulates endothelial cells to release a nitrovasodilator that is potentiated by reduced thiol. *Am J Physiol.* 1989; 28:H804-H812.
246. Mollace, Salvenini VD, Sessa WC and Vane JR. Inhibition of human platelet aggregation by endothelium-derived relaxing factor, sodium nitropruside or iloprost is potentiated by captopril and reduced thiols. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 258:820-823.
247. Mark A, Roddy M, Boles K, Stamler JS. N-Acetylcysteine does not influence the activity of endothelium-derived relaxing factor in vivo. *Hypertension* 1997;29:668-672.
248. Savinski JP, Diczi J, Black J, Arnold JD. A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. *Clin Pharmacol Ther* 1978; 23:73-80.
249. Malcom DS, Hamilton IN, Schultz SC, Cole F, Burhop K. Characterization of diaspirin cross-linked hemoglobin's pressor response. *Crit Care Med* 1992; 20:S106.
250. Katsuyama SS, Cole DJ, Drummond JC, Bradely K. NO mediates the hypertensive response to a modified hemoglobin solution (DCLHb) in rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1994; 22:1-7.
251. Schultz SC, Grady B, Cole F y colaboradores. A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to diaspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med* 1993; 122:301-308.
252. Kilbourn RG, Joly G, Cason B, DeAngelo J, Bonaventura J. Cell-free Hemoglobin reverses the endotoxin-mediated hyporesponsivity of rat aortic rings to  $\alpha$ -adrenergic agents. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994; 199(1):155-162.
253. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996; 80:221-6.
254. Glanz J. Hemoglobine reveals new role as blood pressure regulator. *Science* 1996; 271:1670.
255. Perutz MF. Taking the pressure off. *Nature* 1996; 380:205-206.
256. Wennmalm A, Benthin G, Peterson AS. Dependence of metabolism of nitric oxide in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin. *Br J Pharmacol.* 1992; 106: 507-8.
257. Reddy PL, Bowie LJ, Callistein S. Binding of nitric oxide to thiols and hemes in hemoglobin H: implications for  $\alpha$ -thalassemia and hypertension. *Clinical Chemistry* 1997; 43, No.8:1442-1447.

258. Masuda E, Kawani S, Nagano K, Tsuji S, Takei Y, Tsujii M, Oshita M, Tomoki M, Kobayashi Y, Nakama A, Fusamoto H and Kamada T. Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric-mucosal injury in rats. *Gastroenterology*. 1995; 108:58-64.
259. Gow AJ, Stamler JS. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 1998; 391: 169-173.
260. Nees JE, Hauser CJ, Shippy C, State D, Shoemaker WC. Comparison of cardio respiratory effects of crystalline hemoglobin, whole blood, albumin, and Ringer's lactate in the resuscitation of hemorrhagic shock in dogs. *Surgery* 1982;117:782-786.
261. Malcom DS, Hamilton IN, Schultz SC et al. Characterization of the hemodynamic response to intravenous diaspirin crosslinked hemoglobin solution in rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994; 22:91-107.
262. Asano T, Tannishima T, Sasaki T, Sano K. Possible participation of free radical reactions initiated by clot lysis in the pathogenesis of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. En: Wilkins RH, de. *Cerebral arterial spasm*. Baltimore: Williams & Wilkins Co. 1980;190-201.
263. Toda N. Mechanisms of contracting action of oxyhemoglobin in isolated monkey and dog cerebral arteries. *Am J Physiol* 1990; 258:H57-63.
264. Miao FJP, Lee TJJ. Effects of bilirubin on cerebral arterial tone in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9:666-674.
265. Endo S, Hori S, Suzuki J. Experimental cerebral vasospasm and sympathetic nerve. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1977;17(partII):313-326.
266. Okada H, Endo S, Kamiyama K, Suzuki J. Oxyhemoglobin-induced cerebral vasospasm and sequential changes in vascular ultrastructure. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1980; 20:573-582.
267. Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during autooxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1972;247:6960-2.
268. Reah G, Bodenham AR, Mallick A, Daily EK, Prybelski RJ. Initial evaluation of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb™) as a vasopressor in critically ill patients. *Crit Care Med* 1997; 25(9):1480-88.
269. Aranow JS, Zhuan J, Wang H, Larkin V, Smith M and Fink MP. A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase prolongs survival in a rat model of bacterial peritonitis: comparison with two nonselective strategies. *Shock* 1996; 5(2): 116-21.
270. Pastor CM, Payen DM. Effect of modifying nitric oxide pathway on liver circulating in a rabbit endotoxin shock model. *Shock* 1994; 41:196-202.
271. Pastor CM, Billiar TR. Nitric oxide causes hyporeactivity to phenylephrine in isolated perfused livers from endotoxin-treated rats. *Am J Physiol* 1995; 268:G177-G182.
272. Fischer SR, Bone HG, Powell WC, McGuire R, Traber LD, Traber DL. Pyroxilated hemoglobin polyoxyethylene conjugate does not restore hypoxic pulmonary vasoconstriction in ovine sepsis. *Crit Care Med* 1997; 25(9):1551-59.
273. Crowley JP, Metzger J, Gray A, Pivaacek LE, Cassidy G, Valery CR. Infusion of Stroma-Free Cross-Linked Hemoglobin during Acute Gram-Negative Bacteremia. *Circulatory Shock* 1993; 41: 144-149.
274. Roth RI. Hemoglobin enhances the production of tissue factor by endothelial cells in response to bacterial endotoxin. *Blood* 1994; 83:2860-65.
275. Kaka W, Roth RI, Levin J. Hemoglobin, a newly recognized lipopolysaccharide (LPS)-binding protein that enhances LPS biological activity. *J Biol Chem* 1994; 40:25078-84.

276. McFaul SJ, Bowman PD, Villa VM, Gutierrez-Ibañez MJ, Johnson M, Smith D. Hemoglobin stimulates mononuclear cells to release interleukin-8 and tumor factor  $\alpha$ . *Blood* 1994; 84:3175-81.
277. Griffiths E, Cortes A, Gilbert N, Stevenson P, MacDonald S, Pepper D. Haemoglobin-based blood substitutes and sepsis. *Lancet* 1995; 345:158-160.
278. Lancaster JR. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 8137-8141.
279. Sies H, Brigelius R and Akerboom TPM. Functions of Glutathione: biochemical, physiological, and clinical aspects. Eds. Larson A.L, Orrenius S, Holmgren A and Monnerik B (Raven New York) 1983; pp. 51-64.
280. Beutler E and Dale GL. Coenzymes and cofactors, eds. Dolphin D, Avramovic O and Poulson R (Wiley, New York). 1989; pp 291-317.
281. De Paula M. Tesis doctoral: "Alteraciones bioquímicas en semillas envejecidas de girasol (*helianthus annuus* L.c.v. Perodrik) relacionadas con la viabilidad, funcionalidad de membranas y cambios asociados con la capacidad antioxidante": 38-39.
282. Clancy RM, Levartovsky D, Leszczynska-Piziak J, Yegudin J and Abramson SB. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 3680-3684.
283. Niroomand F, Rössle R, Mülsch A, Böhme E. Under anaerobic conditions soluble guanylate cyclase is specifically stimulated by glutathione. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 161:75-80.
284. Singh SP, Wishnok JS, Keshive M, Deen WM, and Tannenbaum SR. The chemistry of the S-nitrosoglutathione / glutathione system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:14428-14433.
285. Aranow JS, Wang H, Zhuang J, Fink MP. Effect of human hemoglobin on systemic and regional hemodynamics in a porcine model of endotoxemic shock. *Crit Care Med* 1996; 24 (5): 807-814.
286. Stainer RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. En: *Microbiología 2ª edición.* Ed Reverté, S.A. 1991; capítulos 7 y 8: 195-227.
287. International Committee for Standardization in Haematology. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard EP 6/2: 1977) and specifications for international haemoglobinocyanide reference preparation (ICSH Standar EP 6/3:1977). *J Clin Pathol* 1978; 31:139-143.
288. Van Kampen EJ, Zijlstra WG. Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives. *Adv Clin Chem* 1983; 23: 199-257.
289. Saville B. A Scheme for the colorimetric Determination of Microgram Amounts of Thiols. *Analyst.* 1958, vol 83: 670-672.
290. Rodney Mathews W and Steven W Kerr. *Biological Activity of S-Nitrosothiols: The Role of Nitric Oxide.* *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1993, vol 267: 1529-37.
291. Clyne MAA, Thrush BA and Wayne RP. Kinetics of the chemiluminescent reaction between nitric oxide and ozone. *Trans. Faraday Soc.* 1964; 60:359-70.
292. Johnston HS and Crosby HJ. Kinetics of the fast gas phase reaction between ozone and nitric oxide. *J Chem Phys.* 1954; 22:689-92.
293. Fontijn A, Sabadell AJ and Ronco RJ. Homogenous chemiluminescent measurement of nitric oxide with ozone. Implications for continuous selective monitoring of gaseous air pollutants. *Anal Chem* 1970; 42: 575-9.

294. Turner GK. Measurement of light from chemical and biochemical reactions. In *Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications* 1985. (Van Dyke K,ed),CRC Press, Boca Raton,FL, pp.43-78.
295. Sievers nitric oxide analyzer NOA™ 270B. Operation and service manual. Sievers Instruments Boulder, CO, 1992.
296. Cox RD. Determination of nitrate and nitrite at the parts per billion level by chemiluminescence. *Anal Chem* 1985; 52: 332-5.
297. Walters CL, Gillatt PN, Palmer RC, and Smith PLR. A rapid method for the determination of nitrate and nitrite by chemiluminescence. *Food Add. Contam* 1987; 4: 133-40.
298. Town MH, Gehm S, Hammer B and Ziegenhorn J. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1985; 23:591.
299. *Z klin. Chem. u. klin Biochem* 1970; 8: 658 and 1972; 10: 182.
300. Jendrassik L et al. *Biochem Z* 1938; 297: 81.
301. Wahlefeld AW, Herz G, Bernt E. *Scand. J Clin Lab Invest* 1972; 29 (126 Suppl) Abstrad 11.12.
302. Gindler EM, King JD. *Am J Clin Pathol* 1972; 58: 376.
303. Bartels H et al modif. según Bartels. *Clin Chim Acta* 1972; 37: 193.
304. Henry RJ, *Clinical Chemistry*, Harper & Row Publishers, Nueva York 1974.
305. Krieg M et al. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986;24:863.
306. Persijn JP and W van der Slink. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1976;14:421.
307. Marbach EP and Weil NH. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and piruvate. *Clin Chem* 1967; 13: 314-325.
308. *Klin Z. Chem u klin Biochem* 1970;8:658 y 1972;10:182.
309. Wahlefeld AW en Bergmeyer HU: *Methoden der enzymatischen Analyse*, 3a edición, tomo II, Verlag Chemie, Weinheim 1974:1878.
310. Neumann U and Ziegenhorn J. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37 Supplement 147, Abstrad 97.
311. Doménech JM. Medida del cambio: Análisis de diseños con datos apareados. En "Métodos estadísticos en ciencias de la salud". 1997 Editado por Doménech JM. UD 15:9.
312. Kilbourn R. Animal Models of sepsis. En "Methods in nitric oxide research" . Editado por Felisch M, Stamler JS. 1996. Ed. Wiley.
313. Dehring DJ. Sheep and pigs as animal models of bacteremia. In *Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure*. Schalag G,Reds H, editors. Heidelberg, Springer-Verlag, 1993, pp:1060-1075.
314. Van der Poll T, Levi M, Van Deventer SJH et al. Differential effects of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies on systemic inflammatory responses in experimental endotoxemia in chimpanzees. *Blood.* 1994; 83:446.
315. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:293.
316. Milzman DP, Hinson D, Magnant CM. Trauma and pre-existing diseases: overview and outcomes. *Crit Care Clin* 1993; 9:633.



317. Zeigler EJ, Fisher CJ, Sprung CL et al. Treatment of gram negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. *N Engl J Med.* 1991; 324: 429-436.
318. Ochoa JB, Udekwa A, Billiar T. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 1991; 214:621-626.
319. Kross BC, Hallberg GR, Bruner DR, Cherryholmes K, Johnson JK. The nitrate contamination of private well water in Iowa. *Am J Public Health* 1993; 83: 270-2.
320. Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M and Makela SK. Nitrite and nitrate analyses: A clinical Biochemistry perspective. *Clinical Biochemistry* 1998; 31 (4): 195-220.
321. Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J, et al. Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: Nitrite, nitrate and S-nitrosothiols. In: *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1997 pp 177-189.
322. Oda H, Kusumoto S, Nakjima T: Nitrosyl-hemoglobin formation in the blood of animals exposed to nitric oxide. *Arch Environ Health* 1975; 30:453-455.
323. Maeda N, Imaizumi K, Kon K et al. A kinetic study on functional impairment of nitric oxide-exposed rat erythrocytes. *Environ Health Perspect* 1987; 73:171-177.
324. Kilbourn RG. Nitric oxide overproduction in septic shock. Methemoglobin concentrations and blockade with diaspirin cross-linked hemoglobin. *Crit Care Med* 1997; 25(9): 1446-1447.
325. Krafte-Jacobs B, Brilli R, Szabó C, Denenberg A, Moore L, Salzman AL. Circulating methemoglobin and nitrite/nitrate concentrations as indicators of nitric oxide overproduction in critically ill children with septic shock. *Crit Care Med* 1997;25:1588-93.
326. Halliwell B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo?. *FEBS-Lett.* 1997 14; 411 (2-3): 157-60.
327. Mohsenin V. Human exposure to oxide of nitrogen at ambient and supraambient concentrations. *Toxicology* 1994; 89(3): 301-12.
328. Farinati et al. Gastric antioxidant, nitrites, and mucosal lipoperoxidation in chronic gastritis and helicobacter pylory infection. *J Clin Gastroenterology* 1996; 22(4): 275-81.
329. Eiserich JP, Cross CE, Jones AD, Halliwell B, Van der Vliet A. Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Clin Biol Chem* 1996; 27(32):19199-208.
330. Moss GB, DeWoskin R, Rosen AL, Levine H, Palani CK. Transport of oxygen and carbon dioxide by hemoglobin-saline in the red cell-free primate. *Surg Gynecol Obstet* 1976; 142: 357-362.
331. Ferrán M. Análisis de la varianza. En "SPSS para Windows" Editor por Dominguez J. 1996; cap 10:227-251.
332. Doménech JM. Comparación de varias medias: análisis de la varianza. En "Métodos estadísticos en ciencias de la salud". 1997 Editado por Doménech JM. UD 10:23.
333. Abacus Concepts, Stat View Reference. (Abacus Concepts, Inc., Berkley, CA 1996).
334. Staton AG. En "Primer of Biostatistics" 1987 : 88.
335. Staton AG. En "Primer of Biostatistics" 1987 : 26.
336. Szabó C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. En "New horizons: the science and practice of acute medicine" 1995; 3: 2-33.

337. Vicaut E, Houx, Payen D, Bosseau A, Tedgui A. Acute effects of necrosis factor on the microcirculation in rat cremaster muscle. *J Clin Invest* 1991; 85(5): 1537-40.
338. Lorente JA, Landín L, de Pablo R, Renes E, Liste D. L-Arginine pathway in the sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1993; 21: 1287-95.
339. Nagase S, Takemura K, Ueda A, Hirayama A, Aoyagi K, Kondoh M, Koyama A. A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine. *Biochemical and biophysical research communications* 1997; 233: 150-153.
340. Katz R, Pollack M, Spady D. Cardiovascular pulmonary abnormalities in severe acute respiratory failure. *J Pediatr* 1984; 104: 357-364.
341. Zimmerman GA, Morris AH, Cengiz M. Cardiovascular alterations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Med* 1982; 73:25-35.
342. Rosenthal C, Caronia C, Quin C, Lugo N and Sagy M. A comparison among animal models of acute lung injury. *Crit Care Med* 1998; 26 (5): 912-916.
343. Rinaldo JE, Christman JW. Mechanism and mediators of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1990; 11: 621-632.
344. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR y col. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 1988; 318: 1481-1486. (**interés histórico**).
345. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ y col. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9: 371-7.
346. Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP y col. Endogenous nitric oxide as probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo. *Acta Physiol Scand* 1990; 140: 449-57.
347. Mikawa K, Nishida K, Tamada M, Takao Y, Maekawa N, Obara H. Aminoguanidine attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits. *Crit Care Med* 1998; 26(5): 905-911.
348. Gaston B, Reilly J, Drazen JM y col. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1993; 90: 10957-61.
349. Matuschek GM. Liver Dysfunction in sepsis. En: sepsis and multiorgan failure. Edited by: AM Fein, EM Abram, RA Balk et al. Editorial William and Wilins. Baltimore. Pags: 168-180.
350. Fiddian-Green RG. Gastric intramucosal pH, tissue oxygenation and acid-base balance. *Br J Anaesth* 1995; 74: 591-606.
351. Pargger H, Staender S, Studer W, Schellscheidt O, Mihatsch MJ, Scheidegger D, Skarvan K. Occlusive mesenteric ischemia and its effects on jejunal intramucosal pH, mesenteric oxygen consumption and oxygen tensions from surfaces of the jejunum in anesthetized pig. *Intensive Care Med* 1997; 23: 91-97.
352. Freeman G, Dyer RL, Juhos LT et al. Identification of nitric oxide in human blood. *Arch Environ Health* 1978; 33: 19-23. (**interés histórico**).
353. Stieglitz EJ and Palmer AE. The blood nitrite. *Arch Int Med (Chicago)* 1937; 33: 19-23. (**interés histórico**).
354. Cuzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman AL, Szabó C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radical Biology & Medicine* 1998; 24(3): 450-459.

355. Kennedy M, Denenberg AG, Szabó C, Salzman. Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates increased permeability by peroxynitrite in Caco-1BBE Cells. *Gastroenterology* 1998; 114: 510-518.
356. Clerch LB, Wright A, Chung DJ. Evidence that glutathione peroxidase RNA and manganese superoxide dismutase RNA bind the same protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222 (2):590-4.
357. Stamler JS, Hausladen A. Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nat Struct Biol* 1998; 5(4): 247-9.
358. Bone H, Schenarts PJ, Booke M, McGuire M, Harper D, Traber LD, Traber DL. Oxalated pyridoxilated hemoglobin polyethylene conjugated modified normalizes the hyperdynamic circulation in septic sheep. *Crit Care Med* 1997; 25:1010-1018.
359. Bone CM, Bone HG, Waurick R, Van Aken H, Booke M, Prien T, Meyer J. Comparison of the hemodynamic effects of nitric oxide synthase inhibition and nitric oxide scavenging in endotoxemic sheep. *Intensive Care Medicine* 1998;24: 48-54.
360. Hughes GS, Antal EJ, Locker PK, Francom SF, Adams WJ, Jacobs EE. Physiology and pharmacokinetics of a novel hemoglobin-based oxygen carrier in humans. *Crit Care Med* 1996; 24:756-764.
361. Powell C, Schultz SC, Burris DG. Resuscitation with diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb) restores subcutaneous oxygen tension as well as blood in rats. *Surgical Forum* 199; 44:40-12.
362. Aranow JS, Zhuang J, Wang H, Larkin V, Smith M and Fink M. A Selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase prolongs survival in a rat model of bacterial peritonitis: comparison with two nonselective strategies. *Shock* 1996; 5 (2): 116-121.
363. Manual de Técnicas Hitachi 747: Boehringer-Mannheim.
364. Petros A, Lamb G, Loene A, Moncada S, Bennett D, Vallance P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res* 1994; 28:34-39.
365. Stamler JS, Li Jia, Eu JP, McMahon T, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 1997; 276: 2034-2037.
366. Granger DN, Rutigliano G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*. 1981;22.
367. Wever RMF, Lüscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 1998; 97: 108-112.
368. Miles AM, Bohle DS, Glassbrenner PA, Hansert B, Wink DA and Grisham MB. Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J Biol Chem* 1996; 271: 40-47.
369. Davison RL, Travis MD, Bates JN, Lewis SJ. Hemodynamic effects of L- and D-S-nitrosocysteine in the rat. Stereoselective S-Nitrosothiol recognition sites. *Circulation Research* 1996; 79(2):256-262.
370. Travis MD, Davison RL, Stoll JL, Bates JN, Lewis SJ. Evidence that S-nitrosopenicillamine may activate stereoselective S-nitrosothiol receptors on vascular membranes. *Hypertension* 1994; 24: Abstract.
371. Kerger H, Torres Filho I, Rivas M, Winslow R, Intaglietta M. Systemic and subcutaneous microvascular oxygen tension in conscious syrian golden hamsters. *Am J Physiol* 1995; 268: H802.
372. Stryer L. in *Biochemistry*, L. Stryer, Editado por Freeman, San Francisco, CA, 1981: 43-82.

373. Guyton AC, in *Textbook of Medical Physiology* (Saunders, Philadelphia, 1981: 504-513).
374. Torres Filho Y, Kerger H, Intaglieta M.  $pO_2$  measurements in arteriolar networks. *Microvasc. Res* 1996; 51: 202.
375. Casadevall M, Pique JM, Cirera J, Goldin E, Elizalde I, Paves J, Martinez Cuesta M, Bosch J, Rodes J. Increased blood hemoglobin attenuates splanchnic vasodilation in portal hypertensive rats by nitric oxide inactivation. *Gastroenterology* 1996; 110: 1156.
376. Elliot SJ. Peroxynitrite modulates receptor-activated  $Ca^{++}$  signalling in vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1996; 270: L954-L961.
377. Cuzocrea S, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL, Szabó C. Effect of L-buthionine-(S,R)-sulphoximine, an inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase on peroxynitrite and endotoxic shock induced vascular failure. *Br J Pharmacol* 1998; 123(3): 525-37.
378. Keller GA, Barke R, Harty JT, Humphrey E, Simmons RL. Decreased hepatic glutathione levels in septic shock. Predisposition of hepatocytes to oxidative stress: an experimental approach. *Arch Surg* 1985; 120: 941-945.
379. Nemeth I. and Boda D. The ratio of oxidized/reduced glutathione as an index oxidative stress in various experimental models of shock syndrome. *Biomed. Biochim. Acta.* 1989; 48: S53-57.
380. Stein HJ, Hinder RA and Oosthuizen MM. Gastric mucosal injury caused by hemorrhagic shock and reperfusion: protective role of antioxidant glutathione. *Surgery* 1990; 108: 467-473.
381. Liu PT, Ioannides C, Symons AM and Parke DV. Role of tissue glutathione in prevention of surgical trauma. *Xenobiotica* 1993; 23: 899-911.
382. Gatti S, Faggioni R, Echtenacher B and Ghezzi P. Role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates in lipopolysaccharide-induced pulmonary oedema and lethality. *Clin Exp Immunol* 1993; 91: 456-461.
383. Lee KJ, Andrejuk T, Dziuban Jr SW, Goldfarb RD. Deleterious effects of buthionine sulfoximine on cardiac function during continuous endotoxemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209: 178-184.
384. Singh A, Lee KJ, Lee CY, Goldfarb RD and Tsan MF. Relation between myocardial glutathione content and extent of ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 1989; 80: 1795-1804.
385. Liu P, Fisher MA, Farhood A, Smith CW and Jaeschke H. Beneficial effects of extracellular glutathione against endotoxin-induced liver injury during ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 1994; 43: 64-70.
386. Verbunt RJ, Van Dockum WG, Bastiaanse EM, Egas JM and Van der Laarse A. postischemic injury in isolated rat hearts is not aggravated by prior depletion of myocardial glutathione. *Mol Cell Biochem* 1996; 156: 79-85.
387. Becker K, Savvides SN, Kees M, Schirmer RH, Karplus. Enzyme inactivation through sulfhydryl oxidation by physiologic NO-carriers. *Nature Struct. Biol.* 1998; 5: 267-271.
388. Hausladen A, Privalle CT, Keng T, DeAngelo J and Stamler JS. Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* 1996; 86: 719-729.
389. Simon DI, Mullins ME, Jia L, Gaston B, Singel DJ, Stamler JS. Polynitrosylated proteins: characterization, bioactivity, and functional consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 10957-10961.