

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA**

**SINTESIS GASTRICA DE FOSFATIDILCOLINA,
METABOLITOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO,
FOSFOLIPASA A₂ Y RADICALES LIBRES EN EL
SHOCK SEPTICO. ESTUDIO EXPERIMENTAL.**

**TESIS DOCTORAL
JORGE HERNANDEZ CORTES
CURSO ACADEMICO 1994-1995**

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

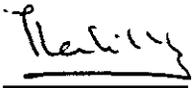
JOSE LUIS BALIBREA CANTERO, Catedrático del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y ELENA VARA AMEIGEIRAS Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

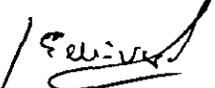
CERTIFICAN: Que la presente Tesis Doctoral, con el título "SINTESIS GASTRICA DE FOSFATIDILCOLINA, METABOLITOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO, FOSFOLIPASA A2 Y RADICALES LIBRES EN EL SHOCK SEPTICO. ESTUDIO EXPERIMENTAL", presentada por D. JORGE A. HERNANDEZ CORTES para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Cirugía y de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y hallándose - concluida autorizamos su presentación a fin de que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Madrid, 23 de Marzo de 1.995

V.º B.º
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis


Prof. Balibrea


Profa. Vara
Ameigeiras

Fdo.: _____
(fecha y firma)

D.N.I.:

Fdo.: _____ 33.202.901
(fecha y firma)

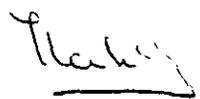
D.N.I.: 2.011.048

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

La Tesis Doctoral "SINTESIS GASTRICA DE FOSFATIDILCOLINA, METABOLITOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO, FOSFOLIPASA A2 Y RADICALES LIBRES EN EL SHOCK SEPTICO. ESTUDIO EXPERIMENTAL", ha sido - realizada por D. JORGE A. HERNANDEZ CORTES, y se ha considerado por el Consejo del Departamento, apta para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

Fecha reunión
Consejo Departamento
30 DE Marzo de 1.995

El Director del Departamento


Fdo.: Prof. J.L. Balibrea
(fecha y firma)

Deseo expresar mi sincero agradecimiento,

Al Prof. José L. Balibrea Cantero, Catedrático del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, principal impulsor de este proyecto, por su empeño en fomentar la investigación y por hacer del trabajo diario un modelo ejemplar de entrega y sacrificio por esta profesión.

A la Dra. Elena Vara, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la U.C.M., por tener la inmensa suerte de poder trabajar bajo su dirección y saber aunar la alegría con la elegancia y el rigor científico. Por su incansable espíritu investigador necesario para realizar este proyecto, por su confianza, por su apoyo y amistad: gracias.

Al Dr. Javier Arias Díaz, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la U.C.M., de brillante labor científica y reconocido prestigio, que ha puesto todo el interés y esfuerzo para llenar de ideas y guiar este proyecto, y sin cuya ayuda no hubiera podido realizarse.

A la Dra. Cruz García, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la U.C.M., por su inestimable ayuda en la realización de esta tesis y por su ánimo en los peores momentos de las largas tardes de laboratorio.

A Nati, por su simpatía y enorme ayuda en todo momento siendo un pilar básico en todas mis tareas de laboratorio.

A un gran cirujano, el Dr. Antonio Torres, Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la U.C.M., cuya capacidad de trabajo es un modelo para todos los que tenemos la suerte de estar bajo su tutela.

Al Instituto Científico Roussel, por su confianza en este proyecto y su beca de ayuda, sin la cual este trabajo quizás no hubiese podido realizarse.

A mis profesores, el Dr. Estrada y el Dr. Martínez, por despertar en mí el interés por el apasionante mundo de la cirugía.

Al Dr. Juan Torres, compañero y amigo, por su generosa colaboración en las distintas fases de realización de esta tesis.

Al Dr. Simón, por su colaboración en las intervenciones quirúrgicas de los animales.

A los compañeros de Residencia, Carmen, Tomás y Andrés, por su amistad y sentido del compañerismo.

A Angel, por su colaboración en las tareas del extraño arte de la informática.

A Josefina, amiga entrañable, por su sincera e incondicional ayuda siempre que me fue necesaria.

A Ana, por su enorme paciencia y apoyo constante en los peores momentos de la realización de esta tesis.

A mis padres y hermanos, porque su ilusión y su apoyo siempre fueron mis mayores
alicientes para alcanzar cualquier cosa en la vida y a quienes debo todo.

A mis padres

INDICE

FUNDAMENTOS	1
Introducción	
Shock séptico	
Patogenia del ulcus de estrés	
Tratamiento del shock séptico y del ulcus de estrés	
Pentoxifilina y somatostatina	
HIPOTESIS DE TRABAJO	60
MATERIAL Y METODOS	62
RESULTADOS	73
Fosfatidilcolina y dipalmitoilfosfatidilcolina	
Mieloperoxidasa	
Metabolitos del ácido araquidónico	
Fosfolipasa A ₂	
Malondialdehido	
Oxido nítrico y nitrosotioles	
Actividad nitrato sintasa	
Monóxido de carbono	
Somatostatina	
Guanosil monofosfato cíclico (GMPC)	
DISCUSION	127
CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFIA	153

FUNDAMENTOS

Introducción

A pesar de los avances realizados en la investigación en antibióticos y terapia intensiva, el shock séptico continua siendo una de las causas principales de muerte en las unidades de cuidados intensivos (1). Aproximadamente, un 50% de los pacientes con shock séptico tratados en las unidades de cuidados intensivos evolucionan hacia la hipotensión refractaria o el fracaso multiorgánico (FMO) progresivo, mientras que la sepsis, especialmente la de origen abdominal, sigue siendo el factor predisponente más común de este último síndrome (2).

Los sistemas orgánicos más frecuentemente afectados son el pulmón, corazón, riñón, tracto gastrointestinal, hígado, sistema nervioso central y sistema de la coagulación. Las consecuencias de la disfunción orgánica son el síndrome del distrés respiratorio del adulto, los trastornos miocárdicos, el fracaso renal agudo, la hemorragia digestiva alta, el fracaso hepático y la coagulación intravascular diseminada. La muerte suele sobrevenir con el fracaso completo de uno ó más de estos sistemas (1).

Una de las principales manifestaciones del FMO es el sangrado por ulceraciones agudas de la mucosa gástrica (úlceras de estrés) (3), el cual se englobaría como una de las posibles manifestaciones del "*fracaso intestinal*", dentro del síndrome de FMO (4). Dicha complicación, incluso de modo aislado, continúa asociándose a un alto riesgo de mortalidad cuando se desarrolla en pacientes sépticos (3) o postoperatorios (4).

TIPOS DE LESIONES AGUDAS DE LA MUCOSA GASTRICA

1- ULCERAS DE ESTRES:

Son unas lesiones gástricas múltiples, superficiales, rodeadas por escasa o nula reacción inflamatoria. Se encuentran siempre en el cuerpo del estómago (porción productora de ácido), pero pueden extenderse distalmente hasta la mucosa antral. Estas lesiones superficiales no penetran más allá de la muscularis mucosae, y por consiguiente, no tienden a perforarse, siendo el sangrado su signo clínico más relevante (5).

Estas úlceras se ven en pacientes politraumatizados, en los sometidos a cirugía, sepsis, fallo respiratorio, hepático o renal (6), y en ellos, los hallazgos histopatológicos más comunes son la presencia de edema, hemorragia, necrosis y exfoliación de la mucosa con trombosis y congestión capilar y/o venular de la submucosa, no apreciándose cambios inflamatorios crónicos (7).

2- ULCERAS DE CURLING:

Son aquellas que aparecen en quemados, siendo su apariencia endoscópica (y, probablemente, su patogenia) similar a las úlceras de estrés (5).

3- ULCERAS DE CUSHING:

Aparecen en pacientes con traumatismo craneoencefálico, suelen ser úlceras profundas del esófago, estómago o duodeno. En estos pacientes se advierte un estado de hipersecreción ácida (8), hipergastrinemia (9) y aumento de pepsina y son lesiones que pueden complicarse con el sangrado o la perforación (5,10).

4- ULCERAS PRODUCIDAS POR FARMACOS:

Suelen ser secundarias a alcohol, ácido acetilsalicílico, glucocorticoides, antiinflamatorios no esteroideos (AINE) u otros inhibidores de las prostaglandinas.

INCIDENCIA DE LA ULCERA DE ESTRES

La incidencia es muy variable, depende fundamentalmente del tipo de pacientes estudiados, de su definición y del método diagnóstico. Hoy se considera que para establecer un diagnóstico de certeza es preciso realizar una gastroscopia que ponga de manifiesto erosiones mucosas gástricas.

Trabajos publicados en la última década señalan una incidencia, en pacientes de alto riesgo que no recibieron profilaxis, cercana al 80% (11), llegando otros autores a reflejar una incidencia del 100% (12). Sin embargo, sólo el 25% de los pacientes sépticos tienen alguna evidencia de sangrado (13) y sólo el 1-2% tienen sangrado manifiesto que obliga a realizar una transfusión (11,14), siendo la mortalidad media, por sangrado gastrointestinal, en estos últimos pacientes del 33% aproximadamente (15).

La incidencia de sangrado por úlcera de estrés ha disminuído en los últimos años. Este descenso se ha atribuído a la realización sistemática de una profilaxis con fármacos antiácidos y, sobre todo, al mejor tratamiento del shock, al conocimiento más profundo de la sepsis, ventilación mecánica y equilibrio hidroelectrolítico y al soporte nutricional de estos pacientes (16).

FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE ULCERAS DE ESTRES Y DE HEMORRAGIA GASTROINTESTINAL

La isquemia es el factor patogénico más importante en el desarrollo de lesiones gastroduodenales y por ello la sepsis y el shock son los factores de riesgo más frecuentes (11,17).

Transtornos del sistema nervioso central. Pacientes con enfermedades intracraneales o TCE tienen mayor incidencia de úlcus y de sus complicaciones (10).

Quemaduras. Cuando afecta a más del 35% de la superficie corporal, la probabilidad de lesión de la mucosa gastroduodenal aumenta significativamente (18,19).

Fallo respiratorio agudo. Es un factor de riesgo importante, pero cuando se necesita ventilación mecánica, el riesgo es aún mayor (20).

Las Alteraciones de la coagulación aumentan el riesgo de sangrado en estos pacientes sépticos (20,21).

Insuficiencia hepática y renal aguda (22,23).

Shock Séptico

Los estados de shock constituyen tal vez el problema más complejo de toda la fisiopatología quirúrgica. Aunque el shock ha sido una entidad reconocida durante más de un siglo, su definición y clasificación se han elaborado con lentitud.

El shock es un síndrome que resulta de la depresión de numerosas funciones, pero en que la reducción del volumen circulante efectivo es de importancia básica y la limitación de la circulación progresa de manera constante hasta convertirse en un estado de insuficiencia irreversible. Se trata, pues, de una situación hemodinámica que conllevará unas repercusiones sobre los órganos, sobre el metabolismo energético de la célula, que es lo que fundamentalmente va a fracasar. Se puede definir, por tanto, el shock como una alteración hemodinámica que va a llevar a un fracaso celular por fallo de sus mecanismos de obtención energética (24).

TIPOS DE SHOCK

1- Shock hipovolémico: Se trata de un estado de tipo hipodinámico, ya que las causas que lo producen tienen como condición una disminución de la volemia. Frente a la caída del gasto cardíaco, el organismo reacciona aumentando las resistencias periféricas (RVP), en un intento de mantener la presión arterial.

2- Shock cardiogénico: También es un estado hipodinámico, aunque lo que fracasa ahora es el corazón como bomba. La sangre se estanca en el territorio venoso y disminuye el volumen minuto, lo que hará que el organismo reaccione aumentando las RVP que a su vez determinará que los territorios orgánicos no reciban el suficiente aporte energético y hará que claudiquen.

3- Shock normovolémico: El shock séptico es el tipo más frecuente del denominado shock distributivo, que se caracteriza por una distribución anormal del volumen vascular que resulta de un descenso de las RVP. Además de la sepsis, otras afecciones pueden conducir a este tipo de shock como son: la intoxicación por toxinas endógenas (metabólicas) o exógenas, enfermedades endocrinológicas, alteraciones de la microcirculación, enfermedades neurológicas y anafilaxia.

En la tabla I se enumeran las causas más frecuentes del shock (24):

FACTORES CAUSALES DEL SHOCK

- I. HIPOVOLEMIA
 - A. Pérdida externa de líquidos
 - 1. Hemorragia
 - 2. Gastrointestinal
 - a) Vómitos (estenosis pilórica, obstrucción intestinal)
 - b) Diarrea
 - 3. Renal
 - a) Diabetes sacarina
 - b) Diabetes insípida
 - c) Exceso de diuréticos
 - 4. Cutánea
 - a) Quemaduras
 - b) Lesiones exudativas
 - c) Sudación y pérdida insensible de agua sin restitución
 - B. Secuestro interno
 - 1. Fracturas
 - 2. Ascitis (peritonitis, pancreatitis, cirrosis)
 - 3. Obstrucción intestinal
 - 4. Hemotórax
 - 5. Hemoperitoneo
- II. CARDIOGENO
 - A. Infarto del miocardio
 - B. Arritmia (taquicardia paroxística o fibrilación, bradicardia grave)
 - C. Insuficiencia cardiaca congestiva grave con disminución del gasto cardiaco
 - D. Factores mecánicos cardiacos
 - 1. Regurgitación mitral o aórtica aguda
 - 2. Rotura del tabique interventricular
- III. OBSTRUCCION A LA CORRIENTE SANGUINEA
 - A. Embolia pulmonar
 - B. Neumotórax a tensión
 - C. Taponamiento cardiaco
 - D. Aneurisma disecante de la aorta
 - E. Intracardiaca (trombosis de la válvula esférica, mixoma auricular)
- IV. NEUROPATICO
 - A. inducido por fármacos
 - 1. Anestesia
 - 2. Bloqueadores ganglionares u otros antihipertensivos
 - 3. "Ingestión" (barbitúricos, glutetimida, fenotiacinas)
 - B. Lesión de la médula espinal
 - C. Hipotensión ortostática (insuficiencia autónoma primaria, neuropatías periféricas)
- V. OTRAS
 - A. Infección
 - 1. Septicemia por gérmenes Gram negativos (endotoxinas)
 - 2. Otras septicemias
 - B. Anafilaxia
 - C. Insuficiencia endocrina (enfermedad de Addison, mixedema)
 - D. Anoxia

TABLA I

Es preciso utilizar un lenguaje adecuado a la hora de hablar de los diferentes trastornos que componen el espectro fisiopatológico de la sepsis. Sólo así tendremos la esperanza de llegar a un reconocimiento precoz de un incipiente compromiso circulatorio en pacientes con sepsis y poder mejorar su supervivencia. Así, Bone (25) estableció una escala de gravedad creciente desde la bacteriemia no complicada hasta el shock refractario (Tabla II) para seleccionar grupos homogéneos de pacientes y evaluar, de esta manera, el pronóstico y efecto de las medidas terapéuticas. No obstante, la sepsis, el síndrome séptico y el shock séptico son el resultado de los mismos procesos fisiopatológicos y componentes del espectro de una misma enfermedad.

ESCALA DE TRANSTORNOS ASOCIADOS CON LA SEPSIS

BACTERIEMIA	Se define como la presencia de bacterias viables en el torrente circulatorio Hemocultivos positivos.
SEPSIS	Es la evidencia clínica de infección más signos de respuesta sistémica a la infección (los siguientes): Taquipnea (> 20 respiraciones por minuto o más de 10 si tiene ventilación mecánica) Taquicardia (> 90 latidos por minuto) Hipertermia (> 38,3° C) o Hipotermia (< 35.6° C)
SINDROME SEPTICO	Es el diagnóstico clínico de sepsis más evidencia de alteración de perfusión de un órgano (uno ó más de los siguientes): PaO ₂ /FiO ₂ no superior a 280 (en ausencia de otra enfermedad pulmonar o cardiovascular) Niveles de lactato elevado Oliguria (< 0,5 ml/Kg peso/h, en pacientes sondados) Alteraciones agudas del nivel de conciencia No son necesarios los hemocultivos positivos
SHOCK SEPTICO PRECOZ	Diagnóstico clínico de síndrome séptico más hipotensión (presión arterial sistólica < 90 mm Hg o una disminución de 40 mm Hg de la presión sistólica basal) que dure al menos 1 hora y no responda al tratamiento convencional (sueros intravenosos o farmacoterapia)
SHOCK SEPTICO REFRACTARIO	Diagnóstico clínico de síndrome séptico más hipotensión (presión arterial sistólica < 90 mm Hg o una disminución de la presión sistólica basal de 40 mm Hg) que dure al menos una hora a pesar de la adecuada reposición de volumen y que requiere drogas vasopresoras o altas dosis de dopamina (> 6 µg/Kg/min.)

TABLA II

El shock séptico continúa teniendo una alta mortalidad, en general superior al 40%. Se estima que se producen, aproximadamente, 400.000 casos de sepsis y 200.000 de shock séptico al año en Estados Unidos, que ocasionan 100.000 muertes (26), lo que representa la 13ª causa de muerte en pacientes mayores de 5 años (27). Para niños entre 1 y 4 años, supone la 9ª causa de muerte (27). Aunque los antibióticos pueden tratar el organismo etiológico, ellos, por sí mismos, no modifican la respuesta del huésped a la infección. La importancia de dicha respuesta viene dada por el hecho de que muchos agentes infecciosos y no infecciosos, como traumatismos, fenómenos autoinmunes, cirrosis o pancreatitis, pueden producir un cuadro clínico de shock séptico (1).

ETIOLOGIA DE LA SEPSIS Y SHOCK SEPTICO

MEDIADORES DEL TIPO NO CITOQUINAS

1- Factores microbianos:

El shock séptico puede estar causado por infecciones bacterianas, virus, protozoos y hongos. De entre esos microorganismos, las infecciones por bacterias Gram negativas son las más frecuentes (28) y, por tanto, las mejor estudiadas y caracterizadas. El *Escherichia coli* es el patógeno más frecuentemente aislado, seguido de las especies de *Klebsiella* y *Enterobacter* (29-31). Las bacteriemias por *Pseudomona aeruginosa*, se asocian a mayor tasa de mortalidad (32).

1a) Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) está considerado como el mediador exógeno más importante del shock séptico (33).

El LPS está compuesto por una fracción antigénica variable de polisacáridos unida al lípido A (34).

LIPOPOLISACARIDO BACTERIANO

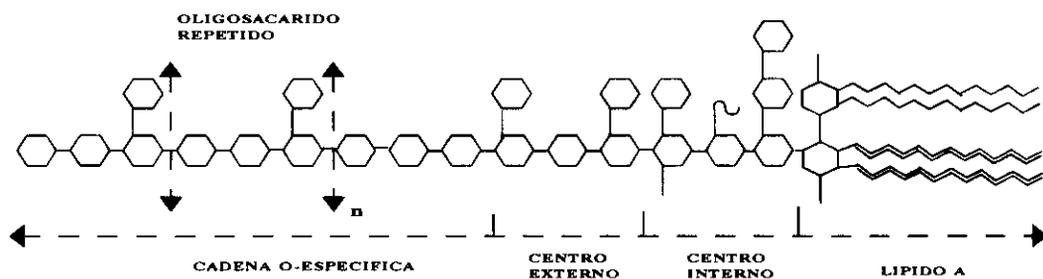


FIG 1.- La endotoxina es un lipopolisacárido compuesto por una serie antigénica variable de azúcares unidas al lípido A.

La fracción de polisacáridos de la molécula consiste en una cadena, específica O, más un centro de oligosacáridos. La cadena O específica contiene cerca de 70 oligosacáridos repetidos cada uno de los cuales contiene 7 residuos de azúcar y es

característico para cada especie. El centro es un oligosacárido que tiene 2 componentes: una fracción interna que contiene azúcares similares en todas las especies y el centro externo que difiere entre las distintas especies y también dentro de una misma.

EL lípido A es un complejo molecular con un componente hidrofílico de azúcar y otro lipofílico de ácido graso (34) y es el principal responsable de la toxicidad y efectos biológicos del LPS (35).

El fenómeno de sepsis acontece como consecuencia de un efecto sistémico secundario a una serie de procesos inflamatorios locales, producidos en respuesta a una infección bacteriana. En la sepsis cambia la conducta de las células inflamatorias, las cuales secretan citoquinas e inician procesos intra y extracelulares con una posible activación de granulocitos y macrófagos. Estas células producen en el medio interno la activación del sistema del complemento y de la coagulación, la generación de radicales libres de oxígeno (RLO) y otros substratos.

La endotoxina inicia una respuesta en el huésped por unión a un receptor y eso produce una activación de diversos procesos intracelulares. En el plasma LPS puede unirse a proteínas como la proteína enlazante de LPS (LBP) (36,37) formando un complejo que puede unirse a la superficie de los leucocitos (38) vía un receptor identificado como CD14. El efecto de la vía LBP/CD14-dependiente es aumentar la sensibilidad de las células al LPS e inducir una respuesta más rápida de citoquinas.

Los estudios realizados "in vitro" demuestran que la endotoxina activa directamente a los neutrófilos para producir elastasa (39) e iones superóxido (40) e indican el mecanismo a través del cual estas células provocan la lesión. Además esos agentes pueden actuar de forma sinérgica (41) produciendo, así, una lesión epitelial considerable en el caso del síndrome del distrés respiratorio del adulto (SDRA).

A pesar del potente efecto de la endotoxina sobre los neutrófilos, es probable que las células efectoras que provocan la lesión orgánica, inducida a través de la endotoxina, sean los macrófagos de los tejidos. Estas células producen numerosos mediadores de la inflamación y responden a la endotoxina produciendo con rapidez grandes cantidades de factor de necrosis tumoral ($\text{TNF}\alpha$) y de IL-1 (42,43). El $\text{TNF}\alpha$ ha sido considerado un mediador central del shock séptico debido a la observación, realizada en 1985, de que un suero policlonal neutralizante del $\text{TNF}\alpha$ fue altamente eficaz impidiendo la muerte de los ratones a causa de la endotoxina (44).

Existen datos que apoyan la idea de que algunos de los efectos de las endotoxinas pueden ser causados por mediadores lipídicos tales como el PAF, los metabolitos del ácido araquidónico y el complemento.

Los estudios "in vitro" indican que los productos del ácido araquidónico ejercen un control sobre la producción del $\text{TNF}\alpha$ e IL-1. El PAF, el leucotrieno B_4 (LTB_4) y el C3a son potentes estímulos para la producción de estas citoquinas (45,46). Sin embargo, la prostaglandina E_2 (PGE_2) (47) puede inhibir la producción de $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 "in vitro" mediante un "feed back" negativo (48). El $\text{TNF}\alpha$ activa la producción de PAF(49), LTB_4 (50) y de tromboxano A_2 por parte de los neutrófilos y cada uno de ellos por sí mismos inducen la actividad oxidativa de los neutrófilos. La inyección directa de PAF reproduce muchos de los efectos del shock séptico. Por otra parte, el empleo de un antagonista selectivo del PAF inhibe la lesión pulmonar producida por la endotoxina en ratas (51).

Se sabe que el LTB_4 es generado por el pulmón en respuesta a la endotoxina y es probable que afecte de forma local a los neutrófilos y/o macrófagos (52).

El papel del tromboxano A_2 está mejor definido. Este agente produce hipertensión pulmonar mediante vasoconstricción de las arteriolas pulmonares y es el responsable de

la hipertensión pulmonar (no de la permeabilidad) que se observa tras la administración de la endotoxina en modelos experimentales (53).

La endotoxemia activa fuertemente el sistema del complemento que a su vez activa a los neutrófilos y puede por sí mismo inducir una lesión pulmonar transitoria (54). En los primates, la perfusión de un anticuerpo dirigido contra la fracción C5a del complemento impide la muerte tras la administración de una dosis letal de *E. coli*. El complemento activado también facilita la adhesión de los neutrófilos al endotelio (55). Consideradas en conjunto, estas observaciones indican que la endotoxina es capaz de generar otros mediadores de la inflamación dependientes de los neutrófilos que pueden amplificar la respuesta inflamatoria.

La endotoxina también activa la cascada de la coagulación, probablemente por activación del factor Hageman y por aumento de monocitos y la expresión endotelial del factor tisular (35).

Taylor y cols. (56) estudiaron los efectos de la inmunización pasiva frente al factor tisular en mandriles con bacteriemia por *E. coli* y observaron que en el grupo placebo, todos se murieron en las primeras 24 horas, mientras que los animales inmunizados sobrevivieron hasta el final del estudio (7 días).

Por otra parte, en la endotoxemia el tono del músculo liso vascular está disminuído ocasionando una hipotensión a pesar de un alto gasto cardiaco. El óxido nítrico (NO) parece jugar un papel importante en la vasodilatación que se produce en modelos de sepsis (57). La vasodilatación es un proceso activo que supone la producción en el citosol de adenosilmonofosfato cíclico (AMPc) y guanossilmonofosfatocíclico (GMPc) que producen una relajación del tono muscular vascular. La guanilatociclasa, enzima responsable de la síntesis de GMPc, se activa por el NO, y se ha sugerido que la hipotensión observada

durante la sepsis puede ser debida a una excesiva producción de NO el cual, vía GMPc, ejerce sus efectos sobre la célula muscular lisa del endotelio (57).

1b) Peptidoglicanos

Son componentes de la pared celular bacteriana. La administración de estas sustancias en animales(58) de experimentación produce fiebre y cambios hemodinámicos comparables a los que se ven tras la administración de la endotoxina: aumento inicial en la resistencia vascular pulmonar, aumento de la permeabilidad pulmonar, aumento del gasto cardiaco. Se ha visto que en conejos y ratas, pero no en humanos, los peptidoglicanos inducen la secreción de 5-hidroxitriptamina y lisis de plaquetas.

1c) Exotoxinas

Las exotoxinas de bacterias Gram positivas pueden provocar un cuadro de sepsis. El más conocido es el TSST-1 (toxic shock syndrome toxin-1) de *S. aureus* que induce la producción de citoquinas IL-1 (59), $TNF\alpha$ (60), IL-2 e interferón- γ (60,61). Las enterotoxinas A y B de *S. aureus* tienen efectos menos dramáticos aunque pueden causar pérdida de peso e inmunosupresión y se cree que también pueden ser mediadas por citoquinas (62).

2- Sistema del complemento

Está considerada como un elemento importante en la patogénesis del shock séptico por que ocasiona un aumento de permeabilidad del endotelio (actividad como anafilotoxina), adherencia de plaquetas, induce la producción del factor tisular por leucocitos y células endoteliales, favorece la producción de IL-1 en los monocitos y potencia en los neutrófilos la capacidad de inferir lesión por mecanismos oxidativos y proteolíticos sobre el endotelio.

La activación del complemento en el shock puede estar mediada, como vimos anteriormente, a) por el LPS tanto por la vía alternativa como por la clásica; b) además, el complemento puede estar activado, directamente, por una lesión tisular extensa (58) y c) por interacción con el sistema de la coagulación (la conversión de C1 → C1' por la activación del factor Hageman), y con los sistemas fibrinolíticos y de kalicreína-kinina (la conversión mediada por plasmina de C1 → C1').

3- Sistema de la coagulación

La sepsis se ve acompañada, frecuentemente, por un proceso de coagulación intravascular diseminada (CID), el cual se puede iniciar por diferentes vías (63,64):

- Vía extrínseca: Existen datos que otorgan un papel importante al factor tisular como requerimiento esencial para desarrollar el proceso de CID (65), inducida por la endotoxina. Así, se demostró en conejos que usando anticuerpos frente al factor tisular se puede prevenir el CID. El factor tisular es producido por los fagocitos mononucleares y

las células endoteliales, por contacto directo con la sangre o bien por estímulo de citoquinas.

- Vía intrínseca: Se ha demostrado "in vitro" que LPS activa directamente al factor Hageman, aunque eso "in vivo" puede no ser importante para provocar un proceso de CID, mediado por LPS (63,65).

- Trombocitos: Experimentos "in vitro" demuestran que el LPS produce la agregación plaquetaria, la secreción de aminas vasoactivas y hace disponible el factor plaquetario 3 (FP3). Eso se ha visto que es un proceso complemento-dependiente, en conejos. Sin embargo, en humanos esos efectos varían de unos estudios a otros y algunas veces no guardan relación con el sistema del complemento y, además, parece que la agregación plaquetaria, la lisis y la disponibilidad de FP3 no son suficientes para producir el CID(33).

- Células endoteliales y CID: Estas células ejercen actividades coagulantes y anticoagulantes, así como fibrinolíticas y antifibrinolíticas que, en condiciones normales, (con el endotelio intacto) están en favor de la actividad anticoagulante y profibrinolíticas (64), pero en situaciones como el shock séptico, como resultado de la exposición a citoquinas (TNF e IL-1), se produce un exceso del factor activador-inhibidor de plasminógeno (PAI-1) que favorece la actividad procoagulante. Además, el endotelio lesionado tiene una actividad procoagulante (66,67) (acción mediada por citoquinas) por exposición de la membrana basal o del colágeno.

4- Factor activador de plaquetas (PAF)

Es un fosfolípido biológicamente activo considerado como un mediador potencial del shock séptico. Es producido por la mayoría de las células incluyendo macrófagos, neutrófilos, plaquetas y células endoteliales (68). Sus efectos son la inducción de la agregación plaquetaria y trombosis intravascular (69), así como un aumento de la permeabilidad vascular e hipotensión, en respuesta a estímulos tanto inmunológicos como no inmunológicos (70). La hipotensión inducida por LPS está asociada con una aparición temporal de PAF en la circulación; por otra parte, antagonistas del PAF pueden revertir el shock inducido por la endotoxina.

5- Neuropeptidos

Dado que se ha visto que la naloxona mejora la supervivencia en modelos de shock inducidos por la endotoxina, se cree que los opiáceos intervienen en el shock séptico. Además se sabe que la endotoxina induce la producción de endorfinas (71,72).

6- Prostaglandinas y Leucotrienos

El tromboxano A₂ (TXA₂) es el principal producto de la vía ciclooxigenasa de las plaquetas. Es un potente vasoconstrictor y estimula la agregación plaquetaria. Sin embargo, la prostaciclina (PGI₂) es el principal producto de la vía ciclooxigenasa del

endotelio y tiene efectos opuestos a la función plaquetaria y tono vascular. Ambos productos aumentan su producción tras la administración de endotoxina en modelos experimentales en animales (33).

La PGI₂ puede contribuir a la hipotensión que se ve en el shock. La fuente de PGI₂ en el shock no está clara, pero se cree que los macrófagos y células endoteliales pueden contribuir. La producción de prostaciclina por las células endoteliales depende de la estimulación por bradikinina (73). El aumento de producción de TXA₂ puede favorecer el CID y la isquemia tisular en el shock. Su producción es independiente del sistema de las kininas (73).

Los macrófagos no sólo producen prostaglandinas sino también productos de la lipooxigenasa (leucotrienos) uno de los cuales puede jugar un papel importante en el shock séptico por su capacidad para regular la producción de citoquinas (74). Se ha demostrado que el leucotrieno B₄ (LTB₄) y LTC₄ pueden inducir la secreción de IL-1 por macrófagos y de interferón γ (IFN- γ) e IL-2 por linfocitos T.

7- Sistema kalicreína-kinina

Se ha demostrado ampliamente que la sepsis produce una activación del sistema kalicreína-kinina y que la plasmina es el principal activador de este sistema. En animales de experimentación la administración de bradikinina provoca alteraciones cardiovasculares similares a los observados durante el shock séptico (73).

La administración de LPS conduce a un rápido descenso de kininógeno y a un aumento de los niveles de bradikinina; similar a lo que sucede en los pacientes con sepsis.

Por otra parte, existen evidencias que otorgan un papel importante a la bradikinina en la patogénesis del shock séptico como resultado de las observaciones en las que el tratamiento con antagonistas de bradikinina reducen la mortalidad en modelos de ratas con shock endotóxico (73).

MEDIADORES TIPO CITOQUINAS

Durante la sepsis por bacterias Gram negativas, la presencia del LPS produce alteraciones significativas de la homeostasis metabólica e inmunitaria del huésped. Muchas de estas alteraciones son el resultado de una compleja cascada de mediadores endógenos, derivados de los fagocitos mononucleares (75). Entre ellos, hay un grupo de proteínas del huésped, denominadas citoquinas, que desempeñan un papel integral en la mediación de la respuesta del huésped a la lesión hística y a la infección por producir cambios en la termorregulación, en la resistencia y permeabilidad vascular, en la función cardíaca, en la función de la médula ósea y en la actividad de enzimas claves. De esas citoquinas, el TNF- α (76) y la interleuquina-1 (77) han sido muy estudiadas por sus papeles fisiopatológicos en la infección y en el traumatismo. En la siguiente tabla se exponen las características comunes a todas las citoquinas (78).

CARACTERISTICAS DE TODAS LAS CITOQUINAS

- Hormonas proteicas activas a concentraciones muy bajas (< 10⁻¹¹) mol/L.
- Producidas durante los estadios efectores de la inmunidad natural y específica.
- Como otras hormonas polipeptídicas, inician su acción mediante la unión a receptores específicos sobre de la superficie de las células diana, donde se regula habitualmente la división celular (es decir, funcionan como factores de crecimiento).
- Producidas por diversos tipos de células, en diversos lugares, y con frecuencia, ejercen acciones que se solapan.
- Actúan sobre una amplia categoría de diferentes células, y con frecuencia, influyen sobre la síntesis de otras citoquinas.
- Sirven para mediar y regular las respuestas inmunitarias e inflamatorias y ejercen importantes acciones *autocrinas*, *paracrinas* y *endocrinas*.
- Suscitan principalmente respuestas celulares lentas que implican síntesis de nuevas proteínas.

TABLA III

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (CAQUECTINA)

Esta citoquina recibió su doble nombre por el descubrimiento de que es capaz de ocasionar caquexia e hipertrigliceridemia en el animal de experimentación (79,80). Fue un término acuñado originalmente por Carswell y col. en 1975 (81). Se trata de un polipéptido de 157 aminoácidos derivado de una prohormona de 233 aminoácidos a través de una serie de divisiones proteolíticas. Esta citoquina interacciona con un receptor específico presente en un gran número de células (82,83) y puede alcanzar una respuesta biológica con una ocupación de sus receptores de sólo un 5% (83). La principal fuente celular del TNF es el fagocito mononuclear activado (84,85).

El principal estímulo fisiológico para la liberación de TNF es el LPS (86). Otros estímulos son: las exotoxinas bacterianas, los virus, los protozoos y los hongos (87,88). La administración de LPS produce una elevación sérica de TNF. Las concentraciones máximas aparecen después de 90-120 minutos y se normalizan hasta la concentración basal a las 6 horas. No obstante, cualquier exposición breve al TNF induce una cascada de

reacciones secundarias que siguen ejerciendo un efecto mucho tiempo después de su desaparición del suero.

La mayoría de las manifestaciones clínicas de la infección por bacterias Gram negativas son probablemente debidas a la actividad de $\text{TNF}\alpha$ y otras citoquinas secretadas por macrófagos expuestos al lipopolisacárido de la pared celular bacteriana. Aunque el mecanismo que compromete al $\text{TNF}\alpha$ en el shock y lesión tisular no está aún del todo determinado, se conoce que esta citoquina puede aumentar la permeabilidad capilar, tiene propiedades quimiotácticas para las células inflamatorias y activa a los neutrófilos y células endoteliales. Por otra parte, $\text{TNF}\alpha$ media el aumento de actividad procoagulante endotelial, induce microtrombosis y contribuye al desarrollo de necrosis y coagulopatía de consumo.

En la siguiente tabla se exponen las funciones del factor de necrosis tumoral (89).

FUNCIONES DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

- Leucocitos y fagocitos mononucleares: TNF induce una leucocitosis y estimula la activación, marginación y migración transendotelial de los neutrófilos y así mejora la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y la inhibición mediada por neutrófilos del crecimiento fúngico. También favorece la maduración y activación de los monocitos y macrófagos.
- Función metabólica: Su efecto global consiste en estimular una redistribución de las proteínas y las grasas a partir de la periferia hacia el hígado durante la lesión. Favorece la liberación de aminoácidos a partir de las proteínas periféricas degradando el músculo esquelético. Estimula la liberación de triglicéridos a partir del tejido adiposo e inhibe la síntesis de ácidos grasos. Induce la glucólisis anaerobia por aumento del transporte celular de glucosa, por deplección de glucógeno y aumento del flujo de lactato. En el hígado, el TNF estimula la captación de aminoácidos y la lipogénesis hepática.
- Efectos centrales: TNF actúa como un pirógeno endógeno a través de la estimulación hipotalámica de prostaglandinas. La fiebre es bifásica y el segundo pico está producido por la liberación de IL-1 inducida por el TNF.
- Coagulación y cicatrización de las heridas: TNF tiene acción procoagulante sobre las superficies endoteliales lo que conduce a la microtrombosis (base de su acción antitumoral). Por otra parte, el TNF induce la proliferación de fibroblastos y microvascular y estimula la liberación de colagenasa.
- En los estados patológicos: Interviene en la movilización de la respuesta inflamatoria aguda. El aumento de TNF, en estas situaciones, representa una vía común en la respuesta del huésped a la lesión física y a la infección grave.

TABLA IV

INTERLEUQUINA-1

La familia de las interleuquina 1 (IL-1) la componen tres moléculas polipeptídicas: IL-1 α , IL-1 β y el antagonista del receptor de la IL-1 (90). Las IL-1 α e IL-1 β poseen un amplio espectro de actividades biológicas, que son inhibidas por el antagonista del receptor de la IL-1. Su vida media en el plasma es de 6 a 10 minutos.

El fagocito mononuclear activado es la fuente principal de IL-1, aunque las células endoteliales, los queratinocitos, los neutrófilos y los linfocitos B también son capaces de producir esta citoquina (91). Aunque el LPS es el principal estímulo fisiológico, otros agentes como la sílice, el TNF y la misma IL-1 también pueden inducir su síntesis (92). A continuación se exponen las funciones de esta citoquina (78).

FUNCIONES DE LA INTERLEUQUINA 1

- **Inmunidad:** IL-1 tiene una potente coestimulación de los linfocitos T, aumenta la síntesis de IL-2 y la expresión de los receptores de IL-2. También aumenta la producción de interferón α y de linfocitos T citotóxicos.
- **Mielopoyesis y función leucocitaria:** IL-1 tiene una importante acción sobre la mielopoyesis directa e indirectamente por la inducción de factores de crecimiento mielopoyético, incluido el GM-CSF. La liberación local de IL-1 estimula la llegada de granulocitos a focos de inflamación aguda y, localmente, estimula la proliferación de los fibroblastos y células musculares lisas de los vasos. Aunque estas acciones son beneficiosas para la localización de la infección, una excesiva marginación de neutrófilos activados mediada por la IL-1 y el TNF puede conducir a la inflamación y congestión pulmonares.
- **Función central y endocrina:** IL-1 es un pirógeno endógeno que eleva la temperatura mediante la inducción de la liberación de prostaglandinas en el hipotálamo anterior. También induce la aparición de anorexia y aumenta la frecuencia y duración del sueño de ondas lentas. Sobre el eje neuroendocrino la IL-1 estimula la liberación de ACTH, la TSH y la somatostatina. IL-1 estimula directamente la liberación de corticoides suprarrenales y la liberación pancreática de insulina y glucagón.
- **Sinergias con el TNF:** El TNF y la IL-1 estimulan su propia liberación y, además, la liberación recíproca y así amplifican la cascada de los mediadores inflamatorios después de la lesión. Ambas tienen acciones sinérgicas sobre la hipófisis, el hueso, el endotelio, el páncreas y los fibroblastos cutáneos y tienen acciones similares sobre la adherencia y activación de los neutrófilos y reacciones inflamatorias. La administración combinada de ambas produce inestabilidad hemodinámica y efectos metabólicos a concentraciones que ejercen efectos mínimos si se administrasen de modo separado. El TNF y la IL-1 favorecen la coagulación intravascular diseminada.
- **En los estados patológicos:** La IL-1 se ha detectado en el suero de niños con púrpura séptica, síndrome de Kawasaki y artritis reumatoide. La producción de IL-1 aumenta significativamente después del traumatismo quirúrgico, la lesión térmica y el shock hemorrágico. Además esta citoquina se detecta en el suero de los pacientes con infección grave.

TABLA V

INTERLEUQUINA-6

La familia de la interleuquina 6 consta de, al menos, seis moléculas diferentes de fosfoglicoproteína (93). Es secretada por los fibroblastos, monocitos y macrófagos y rápidamente liberada a la circulación en respuesta a la lesión y se detecta en la circulación una hora después, aproximadamente, de la administración de LPS (94) y ejerce su efecto mediante la unión a un receptor específico (95).

En estudios "in vitro" se demostró un espectro de acciones que se solapan a las del TNF y la IL-1. Favorece la respuesta de las células linfoides y hematopoyéticas a sus respectivos factores de crecimiento y diferenciación; estimula la producción de anticuerpos por linfocitos B (96) y es el principal estímulo para la síntesis hepática de proteínas fase aguda (97). Por otra parte, la IL-6, tanto "in vitro" como "in vivo", ejerce un efecto inhibitorio sobre la producción de $\text{TNF}\alpha$ (33,98). A pesar de este aparente efecto beneficioso de la IL-6, los niveles séricos de esta citoquina detectados después de un traumatismo hístico o una infección, parecen correlacionarse con la muerte subsiguiente (99). De todas formas, su implicación en la fisiopatología del shock séptico no está totalmente definida.

INTERFERON τ

El interferón τ (IFN- τ) es una glucoproteína sintetizada y secretada por los linfocitos T activados y por las células NK y parece jugar un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria e inmune (33).

Los linfocitos T son estimulados para producir IFN- γ por LPS, mitógenos no específicos, anticuerpos monoclonales reconocidos por los receptores de membrana y por exotoxinas bacterianas. Además estas células necesitan, para una óptima estimulación, la presencia de IL-1 o IL-2.

Las células NK producen IFN- τ al ser estimuladas por mitógenos, LPS (100) o IL-2. Estas células no necesitan la presencia de otras señales para sintetizar el IFN- τ .

EL IFN- τ ejerce sus efectos sobre los macrófagos y células endoteliales y ha sido implicado como un mediador fundamental en el shock séptico (33).

Produce, en los macrófagos, un aumento de la producción de TNF (101), PAF (102), H₂O₂ (103), proteasas (104) y serotonina/melatonina (105); por otra parte, favorece su adhesión a glucoproteínas de membrana (106); también afecta al sistema del complemento por aumento de la producción del factor B, C₂ y C₁-inhibidor(107). Finalmente el IFN- τ reduce la producción por los macrófagos de PGE₂ (108).

En las células endoteliales, el IFN- τ induce la síntesis de proteínas de la vía del complemento (109) y favorece la adhesión de los linfocitos.

El IFN- τ tiene acciones sinérgicas con otras citoquinas, de esta manera, actúa con el TNF α para producir una actividad citotóxica y con la IL-2 para favorecer la liberación de TNF α .

Otras acciones atribuidas al IFN- τ son:

- Aumenta la producción de anticuerpos por las células B activadas.
- Potencia la activación, agregación y actividad fagocítica de los polimorfonucleares.
- Induce la activación de macrófagos, su función antimicrobiana y la expresión de receptores para TNF α .
- Induce la expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I y II.

- Tiene un efecto pirógeno directo en el hipotálamo.
- Puede antagonizar la producción del factor estimulador de colonias de granulocitos/monocitos.

INTERFERON- α/β

Muchas células diferentes pueden sintetizar el interferón del tipo I (IFN- α o β o ambos). Aunque fue una de las primeras citoquinas que se demostró que era inducida por la endotoxina de bacterias Gram negativas, su función biológica es poco conocida. No obstante, en modelos experimentales, el tipo I de interferón mejoró la supervivencia de los animales a quienes se les administró LPS, quizás mediante la modulación de TNF α y otras citoquinas (110,111).

INTERLEUQUINA-8

La interleuquina 8 (IL-8), también llamada proteína activadora de neutrófilos, es el prototipo de una familia de citoquinas conocidas por su actividad quimiotáctica de neutrófilos y monocitos (33). Se producen fundamentalmente en los macrófagos activados, pero también fibroblastos y plaquetas pueden sintetizarla (112,113).

Parece que ejerce sus efectos mediante una acción paracrina e induce la quimiotaxis de neutrófilos y linfocitos y la infiltración tisular por ambos. Además, favorece la degranulación de neutrófilos e inhibe la adhesión endotelio-leucocítica potenciada por el TNF α y la IL-1.

RESPUESTA INTEGRADA DE LAS CITOQUINAS

La secuencia de acontecimientos que conducen al shock séptico por bacterias Gram negativas se inician con la unión de la endotoxina a los receptores de los monocitos y macrófagos (114). Eso produce una activación de los leucocitos y produce la síntesis y secreción de citoquinas, principalmente $\text{TNF}\alpha$ e IL-1. Estas dos citoquinas actúan como mediadores del shock séptico produciendo alteraciones en la resistencia y permeabilidad vascular, en el gasto cardiaco y en la función de la médula ósea. Además, estas citoquinas influyen en la actividad de numerosas enzimas incluida la lactato deshidrogenasa y la lipoproteínlipasa (114).

La disfunción miocárdica, reversible, observada en los pacientes con shock séptico también puede ir ligada a los efectos del $\text{TNF}\alpha$ como se demostró en animales de experimentación (115).

Ambas citoquinas, $\text{TNF}\alpha$ e IL-1, estimulan la producción de otras que perpetúan el proceso séptico.

Es de particular importancia la secreción local de IL-8, que recluta y activa a los neutrófilos, ocasionando una lesión tisular y una disfunción orgánica (116). Concentraciones significativas de IL-8 se alcanzan como respuesta a pequeñas concentraciones de IL-1. $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 inducen la secreción de otros mediadores, incluyendo IL-6, PAF, prostaglandinas y leucotrienos (115), y son responsables de la activación del sistema del complemento, de la coagulación y del sistema de las kininas.

Además de la secreción de citoquinas, la cascada de la sepsis compromete la producción y secreción de sustancias anticitoquinas, incluido el receptor antagonista de IL-1 y otros receptores solubles de las citoquinas.

Otras, como IL-4 e IL-10 parecen tener una actividad predominantemente antiinflamatoria y pueden causar una disminución en la síntesis de $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 (116), en respuesta a la estimulación por LPS. La actividad de $\text{TNF}\alpha$ parece estar modulada "in vivo" por receptores de TNF. Así, se observó que la inducción de leves endotoxemias en humanos, aumentaba la concentración plasmática de esos receptores (117), que puede tener dos consecuencias:

por un lado, que las células sean, temporalmente, menos sensibles a los efectos del $\text{TNF}\alpha$, y por otro, la formación del complejo receptor-ligando, que disminuye la concentración de $\text{TNF}\alpha$ libre, puede actuar como un reservorio para asegurar bajas concentraciones de esta citoquinas durante largos periodos de tiempo.

OTROS MEDIADORES

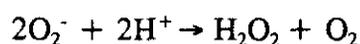
1- RADICALES LIBRES DE OXIGENO

Como vimos anteriormente, el LPS en la circulación induce la secreción de una variedad de mediadores que, en última instancia, conducen a la activación de los neutrófilos, los cuales secretan radicales libres de oxígeno (RLO) (118).

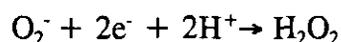
Habitualmente el oxígeno se encuentra en su forma más estable, que es la molécula de O_2 , la cual es sólo moderadamente reactiva. Sin embargo, en determinadas condiciones, por reacciones químicas, por acción enzimática o por efecto de las radiaciones ionizantes, pueden producirse una serie de especies químicas (radicales libres) (119), capaces de dar

lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo y producir, así, una lesión celular.

Un radical libre es aquella especie química, cargada o no, que tiene en su estructura un electrón desapareado (120). El radical superóxido se forma por reducción de un oxígeno molecular (121): O_2^- y tiene lugar en la cadena de transporte electrónico microsomal o mitocondrial, o mediante sistemas enzimáticos de oxidación como el de la xantino oxidasa, aldehído oxidasa, flavina deshidrogenasa, amina oxidasa, NADPH oxidasa, ciclooxigenasa y lipooxigenasa (121). El radical superóxido es relativamente inestable, con una vida media de algunos milisegundos, y experimenta reacciones de dismutación, espontánea o catalizada por la superóxido dismutasa, que consisten en la reacción entre dos radicales para dar agua oxigenada y oxígeno (122).



Cuando la molécula de oxígeno recibe dos electrones:



El producto formado es el agua oxigenada o peróxido de hidrógeno, estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición y que se forma en muchos procesos en los organismos vivos (123). Este producto no es un radical libre pero, en contacto con iones ferrosos o cúpricos o en presencia de superóxido y sales de hierro da lugar a la formación de $OH\cdot$.

El radical hidroxilo ($OH\cdot$) es una de las especies químicas más reactivas que se

conocen y puede formarse por reacciones del tipo:



La acción de los RLO está normalmente limitada por los sistemas de defensa antioxidantes y la lesión ocurre sólo si está aumentada la producción de RLO y/o las defensas antioxidantes están disminuídas.

La producción de RL es un componente fundamental de la actividad microbiana de los neutrófilos, pero también puede ser importante su producción por otros tipos celulares como células endoteliales, macrófagos y monocitos.

La acción de los radicales libres está limitada normalmente por un sistema de defensa antioxidante, de manera que la lesión tisular acontece cuando la producción de radicales es excesiva y/o cuando las defensas antioxidantes están disminuídas. Esto sucede en situaciones como: fenómenos de isquemia-reperfusión, pancreatitis, preservación de órganos para el transplante, sepsis grave, fracaso renal y hepático agudos, SDRA, colitis ulcerosa y otros procesos inflamatorios (124). En estas situaciones la destrucción tisular puede medirse mediante la determinación de los productos resultantes de la peroxidación lipídica en los tejidos isquémicos (malondialdehído y conjugados dienos). En la siguiente tabla se muestran los cuatro grupos de sistemas antioxidantes endógenos (125):

ANTIOXIDANTES ENDOGENOS

1. Componentes de bajo peso molecular como las vitaminas, C y E, y los β carotenos.
2. Agentes capaces de donar el grupo sulfidrilo: el glutatión.
3. Proteínas con grupos sulfidrilo.
4. Enzimas con superóxido dismutasa o catalasa.

TABLA VI

Itoh y Guth (126) demostraron, en modelos experimentales, que los radicales libres de oxígeno juegan un papel importante en las lesiones de la mucosa gástrica inducidas por shock hemorrágico.

2- OXIDO NITRICO

En 1980, Furchgott y Zawadzki (127) demostraron que el revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos era esencial para la acción relajante provocada por la acetilcolina y que este efecto estaba mediado por la secreción de una sustancia endotelial que fue conocida, posteriormente, como factor relajante derivado del endotelio (EDRF). En 1987 se descubrió la síntesis de óxido nítrico (NO) en el hombre, una sustancia secretada por las células del endotelio vascular y cuyos efectos eran indistinguibles de los del EDRF, por lo que fue identificado con él.

El NO ha sido implicado en diversos procesos fisiológicos, que incluyen la relajación del músculo liso, la inhibición de la agregación plaquetaria, la neurotransmisión y la regulación inmunológica (128).

El óxido nítrico se sintetiza a partir del nitrógeno de la guanidina terminal de la molécula de L-arginina, por acción de una enzima, llamada nitrato-sintasa, formando NO y citrulina (129). El NO formado reacciona rápidamente con el O_2 formando nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). El NO_2^- , a su vez, reacciona con la oxihemoglobina para producir NO_3^- y metahemoglobina (130). La síntesis de NO se realiza de forma fisiológica en el endotelio, en el sistema nervioso central y periférico y en las plaquetas, y depende de una enzima nitrato sintasa constitutiva que está siempre presente en los tejidos (128,131). Este

enzima es calcio y calmodulina dependiente y libera pequeñas cantidades de NO durante cortos periodos de tiempo tras su activación por sustancias como acetilcolina y bradiquinina en receptores específicos o por el efecto del flujo sanguíneo sobre las células endoteliales. El NO producido difunde hacia el músculo liso, induciendo su relajación por activación de la guanilato-ciclasa y generación de GMPc (131) y es responsable del tono vasodilatador del sistema cardiovascular en condiciones fisiológicas (132).

Existe otra isoforma del enzima nitrato sintasa, denominada inducible, formada por las células del sistema retículo endotelial en presencia de endotoxina, TNF, IL-1 e IFN- γ (133). Este enzima inducible es calcio y calmodulina independiente y libera grandes cantidades de NO, durante periodos prolongados. Este NO así formado es utilizado como un sistema citotóxico contra bacterias, hongos y parásitos y también contra células tumorales. Este enzima inducible también se ha visto en el hígado, en hepatocitos y células de Kupffer, en los neutrófilos y en la pared vascular (131). Tanto el endotelio como el músculo liso vascular son capaces de expresar esta isoforma inducible.

En situaciones como el shock séptico, se produce una liberación masiva de NO en la pared vascular, que explica la hipotensión e hiporreactividad a los vasoconstrictores. Esta vasodilatación puede ser revertida por análogos de la L-arginina como la N^gmonometil-L-arginina (L-NMMA) tanto en los animales de experimentación como en el humano (134,135).

Por otra parte, otros autores han demostrado un efecto beneficioso del NO en el mantenimiento de la integridad de la vasculatura intestinal en ratas tratadas con LPS (136).

En el shock séptico se objetiva una disfunción ventricular específica no ligada a la vasodilatación (137) y un aumento de cGMP en el miocardio. Recientemente se demostró en animales con shock endotóxico un aumento de síntesis de NO en la pared ventricular

y es posible que la disfunción cardiaca en el shock séptico sea, en parte, inducida por este exceso en la producción de NO (138).

El NO también está implicado en SDRA; recientemente se ha observado que la inhalación de NO a concentraciones inferiores a 50 ppm, provoca una disminución de la presión de la arteria pulmonar, mejoría de la oxigenación y disminución del cortocircuito arteriovenoso, sin provocar hipotensión sistémica.

La relación del NO con el desarrollo de úlceras de estrés se establece por varios motivos: en primer lugar, la importancia de las alteraciones microcirculatorias en el desarrollo del úlcus de estrés. Es conocido que el NO modula el tono basal de la microcirculación gástrica (139).

El NO endógeno, en estudios experimentales, se ha mostrado como un agente protector de la mucosa gástrica. Recientemente Masuda y cols. (140) han demostrado, en un modelo experimental en ratas, que el NO endógeno protege a la mucosa gástrica frente a la lesión inducida por etanol. Aunque no está bien determinado este mecanismo, parece probable que la vasodilatación o la inhibición de la agregación plaquetaria están implicadas en él (139), sin descartar que tenga otras acciones en la mucosa, que preserven la función celular epitelial y su continuidad. La fuente de NO endógeno para esta acción protectora parece ser la vasculatura gástrica tanto en situación de reposo como por estimulación de agentes gastroerosivos (140).

ENDORFINAS

Los opiáceos endógenos fueron relacionados con el shock séptico tras las observaciones realizadas con la naloxona, un potente antagonista de los opiáceos. Esta sustancia mejoró la supervivencia en modelos experimentales de shock séptico. Por otra parte, el LPS induce la producción de endorfinas (71,72).

Tratamiento del shock séptico

En todo paciente con sepsis se deben de tomar unas medidas generales que van a ir encaminadas a corregir el riesgo hístico y a la restitución del gasto cardiaco. El paciente se tratará en una unidad de cuidados intensivos con objeto de vigilar continuamente la presión intraarterial, pulmonar arterial en cuña y venosa central, siendo necesario realizar determinaciones frecuentes de gases en sangre arterial, pH y electrolitos séricos.

El tratamiento convencional se basa en un control precoz de la infección con antibióticos adecuados y la eliminación del foco séptico (en general con el drenaje de los abscesos). Como se comentó anteriormente, es importante el control hemodinámico cardiovascular por medio de fluidoterapia intravenosa adecuada y el uso de fármacos vasoactivos adecuados a las necesidades del paciente. Por último, es frecuente que se requiera un soporte ventilatorio mecánico, así como un preciso control de aporte nutricional.

MODULACION DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Podemos considerar cuatro fases teóricas en el transcurso de la respuesta inflamatoria sistémica a la infección:

1- La fase de inducción, en la cual el LPS interacciona con células del sistema inmunológico iniciando toda una cascada de reacciones que llevarán al individuo, finalmente, a la situación de fracaso multiorgánico y muerte.

Parece lógico, por tanto, que se intente bloquear esta cadena de acontecimientos mediante sustancias como los anticuerpos antiendotoxina. En este sentido, Ziegler y col., en 1982 (141), trataron pacientes con bacteriemia y sepsis con suero hiperinmune contra la cepa J5 de *E.coli*, observando una disminución de la mortalidad en ellos frente a otro grupo control. Posteriores estudios, realizados por distintos autores, no han logrado los mismos resultados (142,143), con lo cual, se puede concluir que el uso de esta terapia tiene sus limitaciones, como lo corrobora La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (144).

2- La fase de síntesis y secreción de citoquinas.

En ella, se produce la transcripción del RNAm a partir del DNA y, posteriormente, ese RNAm se expresa como proteína (traducción) (27).

La fase de transcripción de RNAm se puede bloquear mediante sustancias como pentoxifilina y amrinona (27): ambos son inhibidores de la fosfodiesterasa y aumentan los niveles de AMPc intracelular lo que, por un mecanismo desconocido, interrumpe la señal intracelular disminuyendo la respuesta celular al LPS (145,146). La pentoxifilina

disminuye la síntesis de $\text{TNF}\alpha$ en modelos experimentales de shock endotóxico en animales (147). La amrinona se ha mostrado, incluso, más potente en la inhibición de la síntesis de TNF inducida por LPS (148).

El bloqueo de la fase de traducción puede conseguirse con corticosteroides. En diversos modelos experimentales de sepsis, producida por gérmenes Gram negativos o por endotoxina, se ha mostrado el efecto beneficioso del tratamiento con corticoides, especialmente si se realiza como profilaxis o en las primeras etapas de la infección, lo que condiciona la utilidad de estos fármacos (149). De todas formas, persisten las controversias acerca de la utilidad de los corticoides en la sepsis.

3- Esta fase está representada por la cascada de las citoquinas. Los datos actuales apuntan a una incontrolada producción de citoquinas como causa de morbilidad y mortalidad inducida por la sepsis. Una gran cantidad de estímulos inducen la actividad de esas citoquinas, por eso se han intentado aplicar terapias que pudieran bloquear dichas actividades.

Los efectos del $\text{TNF}\alpha$ pueden ser bloqueados por: anticuerpos monoclonales, que se unan a la citoquina y la inactiven; receptores solubles que ligen la citoquina libre e impidan su unión a receptores de membrana; y anticuerpos monoclonales anti-receptor del $\text{TNF}\alpha$, que compitan con la citoquina por la unión a sus receptores de membrana (150). El pretratamiento con anticuerpos monoclonales anti- $\text{TNF}\alpha$ en diversos modelos de sepsis y SDRA, previene la mortalidad (151,152).

El empleo del antagonista del receptor de la IL-1, inhibidor de IL-1, redujo la mortalidad en modelos experimentales de shock séptico, en conejos, cuando se administraba durante las primeras horas del shock (153). En estudios clínicos, el uso de

ese antagonista del receptor de IL-1, no demostró una mejora en la supervivencia.

4- Englobaría a los segundos mediadores y otros productos que causan la lesión tisular, esto es: metabolitos del ácido araquidónico, radicales libres de oxígeno, óxido nítrico y el factor activador plaquetario.

Inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico como la indometacina y el ibuprofeno redujeron la lesión pulmonar inducida por la endotoxina en animales de experimentación (154).

Se ha investigado el empleo de indometacina combinada con antagonistas de los receptores de leucotrienos o bien con inhibidores de la lipooxigenasa, obteniéndose una mejoría en la prevención del desarrollo de un fracaso multiorgánico, en modelos experimentales con animales (155).

Por otra parte, se han ensayado nuevas terapias que actúan a nivel de los radicales libres de oxígeno. En este sentido, existen estudios clínicos randomizados, en pacientes con distrés respiratorio secundario a sepsis, que muestran la utilidad de la N-acetilcisteína (un agente antioxidante) (156).

Los primeros estudios realizados con la N^o-monometil-L-arginina (LNMA), un inhibidor de la nitrato sintasa, en pacientes con shock séptico, mostraban unos resultados alentadores (157). Sin embargo, existe una preocupación ya que esa inhibición produce una vasoconstricción, que lesiona a los órganos por la hipoperfusión que provoca. Así, en modelos animales con shock endotóxico, tratados con inhibidores de la nitrato sintasa, se comprobó un aumento de las lesiones en diferentes órganos.

Diversos antagonistas del receptor del factor activador de plaquetas fueron utilizados en animales de experimentación con shock endotóxico mostrando una protección frente a las complicaciones fatales del shock séptico (158,159).

Fisiopatología del ulcus de estrés

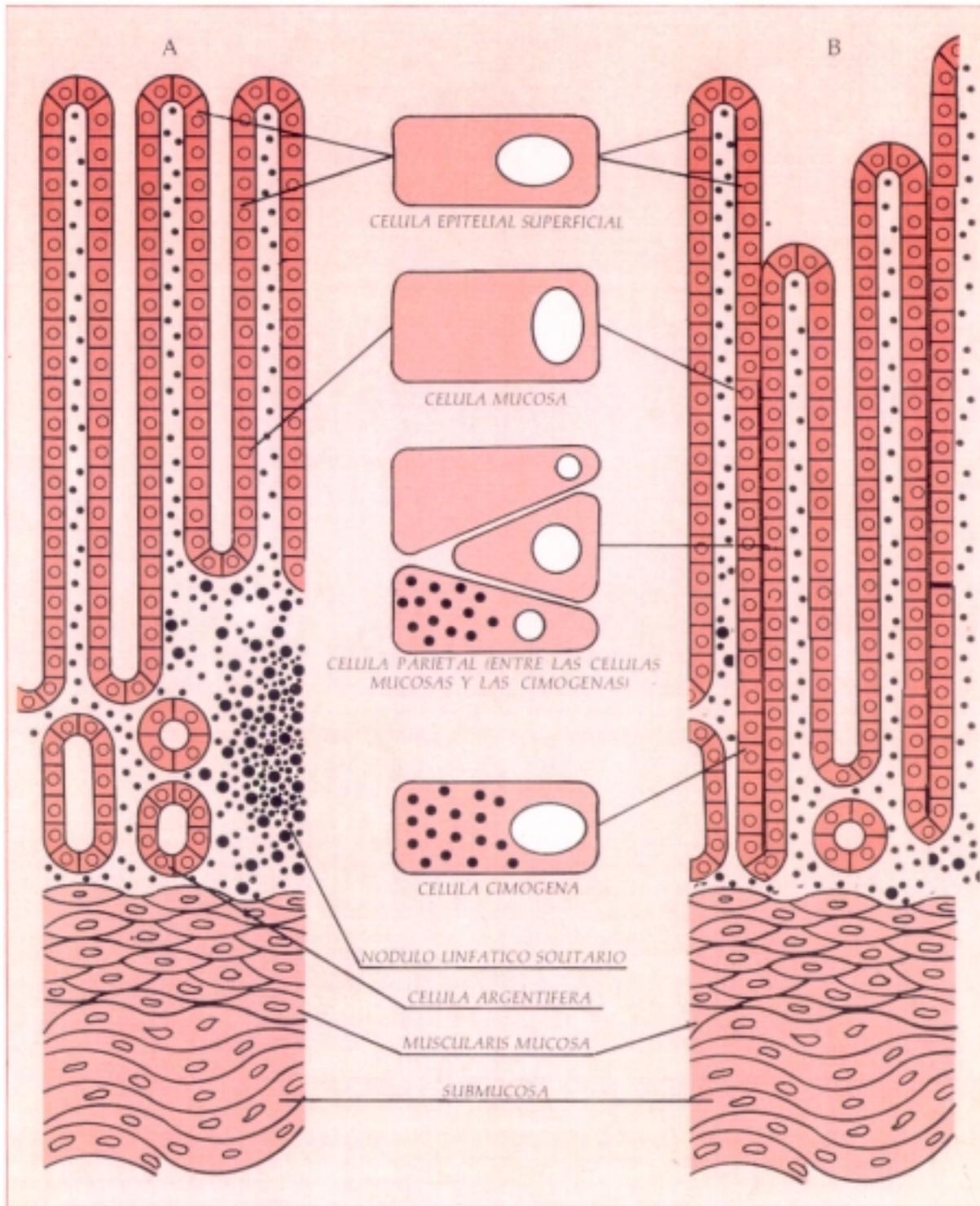
En la patogenia de las lesiones agudas de la mucosa gástrica, están involucrados varios factores entre los que destacan:

1- Hipersecreción ácida.

Aunque la presencia de ácido y pepsina intraluminal, parece necesaria para producir lesiones por estrés en la mucosa gástrica (160,161), no es un requisito imprescindible para que se formen dichas úlceras (162). De hecho, sólo en las úlceras agudas asociadas a lesiones neurológicas y sepsis se ha demostrado un aumento, en fases iniciales, de la secreción ácida (163), aunque posteriormente, se produce una reducción en la misma. Esta reducción es una de las características más importantes del ulcus de estrés, y parece que el mecanismo clave involucrado en su producción es la disminución de la secreción ácida por la célula parietal (164).

Aunque la retrodifusión de protones desde la luz gástrica al interior de la mucosa ha sido implicada como un importante factor etiológico para la úlcera de estrés secundaria a sepsis (165), ello es difícil de determinar, por la dificultad que entraña el medir el flujo de H^+ a través de la mucosa. Además, una acidez alta asociada a hemorragia o sepsis no es suficiente, por sí misma, para producir ulceraciones, sino que es necesario la existencia adicional de agentes irritantes locales, como por ejemplo los ácidos biliares, para que se produzcan lesiones en la mucosa (166).

En este sentido, en pacientes graves, e influido tal vez por la presencia de un fleo adinámico, se produce un reflujo de bilis al estómago (atonía pilórica) y así, los ácidos biliares, fundamentalmente el ácido taurocólico, entrarían en contacto con la mucosa gástrica (164).



**Fig 2. Disposición histológica de las células de la capa epitelial.
 A: glándulas pilóricas; B: glándulas fúndicas**

2- Anoxia gástrica.

La isquemia de la mucosa gástrica está considerada como uno de los principales factores precipitantes en la patogénesis de las úlceras agudas de la mucosa.

Experimentalmente, se ha demostrado que incrementando el flujo sanguíneo gástrico se evita la formación de úlceras(167); sin embargo, en la sepsis, en donde son frecuentes las lesiones gástricas y que es, además, la causa más frecuente de sangrado por este tipo de úlceras (11), el descenso del flujo sanguíneo no es un hallazgo constante, e incluso, en modelos de shock séptico experimental, se constata un flujo sanguíneo inalterado o ligeramente aumentado (168,169). Aunque estas diferencias fisiopatológicas se han intentado explicar basándose en un incremento de las demandas tisulares de O₂ o en una reducción en su utilización durante la sepsis, aún permanecen amplias lagunas en el conocimiento de la patogenia del *ulcus de estrés*.

3- Alteración de los mecanismos de defensa de la mucosa gástrica.

Los principales factores involucrados clásicamente en la defensa de la mucosa gástrica son la producción de moco, hacia el que se vierte una secreción rica en bicarbonato, y la capacidad de regeneración epitelial. Por otra parte, la mucosa gástrica es capaz de liberar una serie de mediadores capaces de proteger o agravar la agresión tisular. Se trata de metabolitos del ácido araquidónico, el factor activador de las plaquetas (PAF) y los radicales libres de oxígeno (170).

La reparación de una lesión epitelial se caracteriza por la migración de las células mucosas sobre la lámina basal intacta, con restitución histológica y fisiológica de la continuidad y está facilitado por un escudo protector formado por células necróticas, detritus y moco que forman una red que retiene el exudado alcalino que proviene de

capilares situados bajo el epitelio superficial dañado. No es, en sí, un proceso de renovación celular. Es, probablemente, el primer y más importante acontecimiento de la defensa de la mucosa y es un proceso que ocurre a pH luminal de 1 y que se ve deteriorado por situaciones como acidosis tisular e isquemia (5).

La integridad de la mucosa gástrica depende de un delicado equilibrio entre factores agresivos y factores protectores. La lesión o ulceración gástrica estará ocasionada por un imbalance entre dichos factores.

Entre los factores protectores, la integridad de la barrera mucosa gástrica, denominada barrera mucosa de Davenport, parece jugar un papel esencial (164). Las células mucosas superficiales constituyen una capa simple de células columnares con gránulos de mucina en el interior del citoplasma, los cuales migran hacia la superficie. El moco está formado por una capa de gel insoluble que se adhiere a la superficie y otra de moco soluble que se mezcla con los jugos de la luz gástrica. Su grosor es de aproximadamente 200 μm . Está constituido principalmente por glicoproteínas neutras que contienen ácido siálico y mucopolisacáridos (171), asociados a lípidos. Entre sus funciones se incluyen el proteger mecánicamente a las células de la mucosa gástrica, formar, junto con el bicarbonato vertido, un gradiente de pH que proteja la mucosa frente a una elevada concentración de H^+ y retener agua.

La producción de las úlceras de estrés se asocia a una disminución de la cantidad de moco (172).

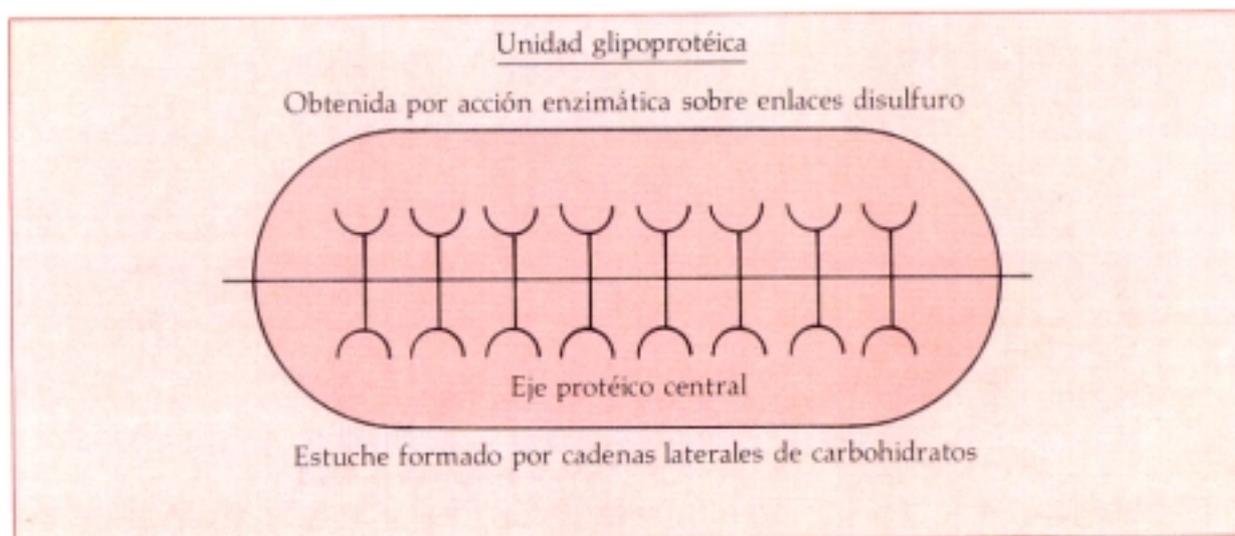
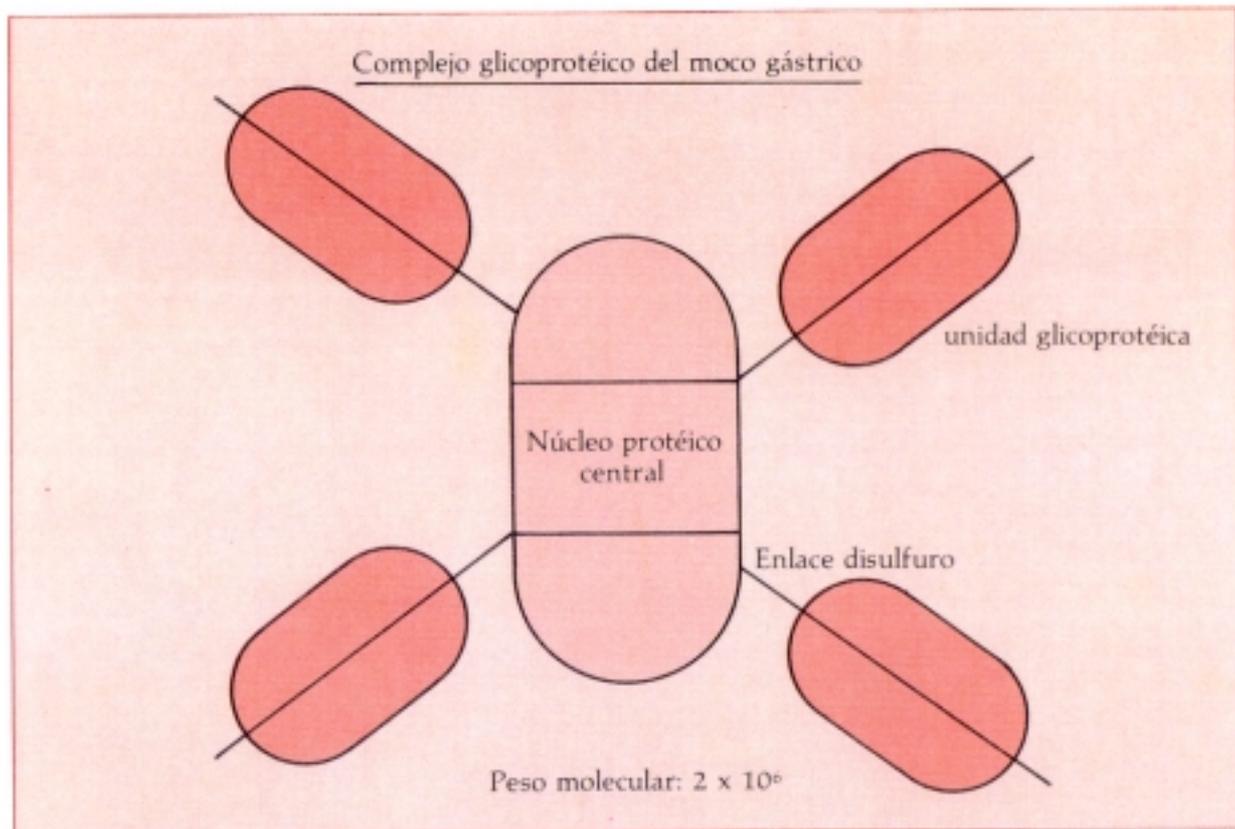


Fig 3. Composición química del moco gástrico.

La síntesis de moco se ve favorecida por la estimulación vagal, la administración de secretina o ciertas prostaglandinas (PGE_2). Su síntesis y secreción se ve interferida por sustancias como esteroides, AINES o ACTH.

Las prostaglandinas (PG) son mediadores procedentes del metabolismo del ácido araquidónico. Este ácido graso es liberado de las membranas celulares, por la acción de la fosfolipasa A_2 (PLA_2). Entre ellas, fundamentalmente la PGE_2 tiene propiedades citoprotectoras de la mucosa gástrica (173).

La secreción de bicarbonato en el estómago ocurre por medio del intercambio entre Cl^- y HCO_3^- en la membrana luminal de las células parietales. El bicarbonato difunde al interior del moco y forma una capa que neutraliza los iones H^+ de la luz gástrica, manteniendo un gradiente de pH entre el lado epitelial (alrededor de 7.3) y el luminal (pH 2) (172).

Además de este gradiente de pH, un componente importante de la eficacia de esta barrera es su hidrofobicidad, pudiendo rechazar, por ello, el ácido gástrico acuoso. Esa hidrofobicidad puede ser explicada por la presencia de una capa de fosfolípidos en la superficie mucosa. El principal componente fosfolipídico del moco gástrico es la fosfatidilcolina (PC), que representa aproximadamente el 42-45% de la composición total de fosfolípidos de dicha barrera (174) y que juega un papel importante en el mantenimiento de la citada hidrofobicidad (175).

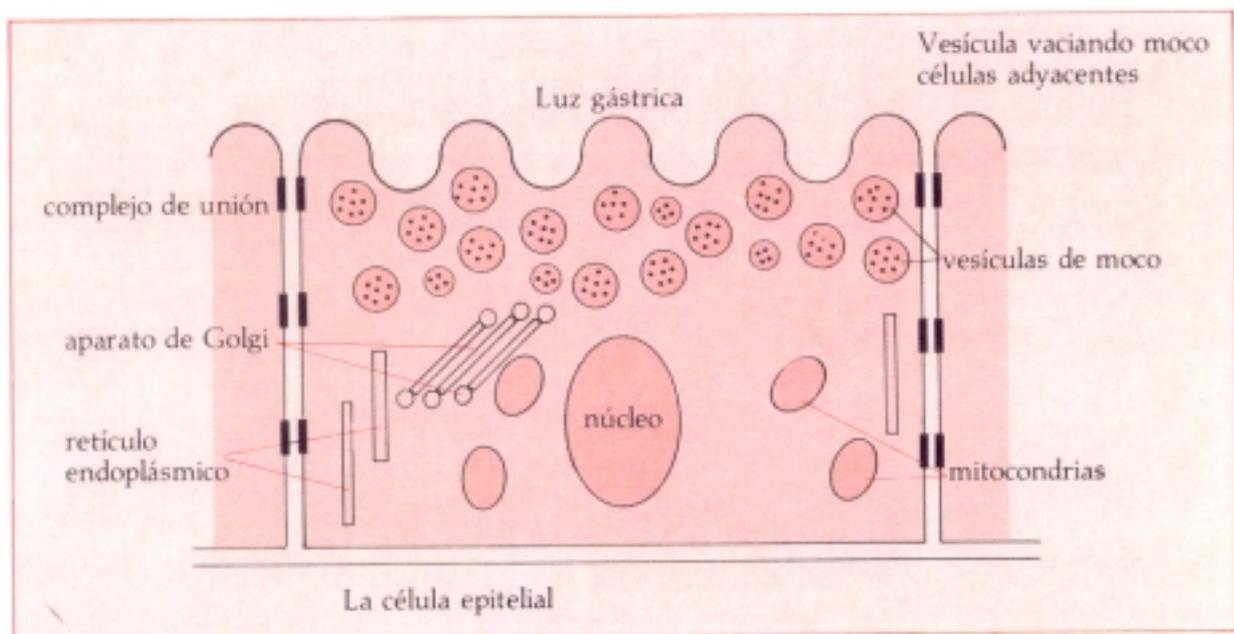


Fig 4. Estructura histológica de la célula epitelial.

En la tabla siguiente se recoge la composición de fosfolípidos de la mucosa gástrica de distintas especies:

% FOSFOLIPIDOS	RATAS	HUMANOS	PERROS
LisoPC	3.1 ± 0.5	1.9 ± 1.1	2.6
Esfingomielina	6.4 ± 0.6	6.9 ± 0.4	7.2
PC	42.0 ± 1.0	44.8 ± 2.7	43.7
P-serina/ P-inositol	13.5 ± 0.5	10.8 ± 1.3	13.4
P-etanolamina	29.0 ± 0.9	31.5 ± 2.0	28.8
Cardiolipina	6.0 ± 0.8	4.1 ± 1.3	4.3

Aproximadamente el 30% de la PC está en forma disaturada (dipalmitoilfosfatidilcolina, DPPC), siendo curiosamente la mucosa gástrica y el pulmón los únicos lugares del organismo donde pueden apreciarse cantidades significativas de DPPC, y así, por analogía con el pulmón, podemos hablar de la existencia de un "surfactante gástrico".

Existen evidencias que demuestran que el epitelio gástrico es una fuente de surfactante fosfolipídico y que la PGE₂ aumenta la secreción de este supuesto material protector(5). Este aumento de surfactante unido al aumento de producción de moco, que vimos antes que también inducía la PGE₂, favorece la asociación de ambos componentes en una acción sinérgica protectora de la mucosa. Además, la PGE₂ está presente en concentraciones

elevadas y ejerce efectos sobre la secreción de moco y bicarbonato, la secreción ácida (pudiendo tener un efecto como mediador de la acción de la secretina) y el flujo sanguíneo de la mucosa (176,177).

En las lesiones que acontecen en la mucosa gástrica parecen estar especialmente implicados la producción del daño endotelial mediado por neutrófilos (178,179), la generación de radicales libres de oxígeno (RLO) (180), el PAF y la activación de la cascada del ácido araquidónico (181). De hecho, los agentes que interfieren con estos mecanismos mejoran la úlcera de estrés sin requerir alteraciones en el pH gástrico (182,183).

El Factor activador de las plaquetas (PAF) es un fosfolípido biológicamente activo producido por la mayoría de las células, incluyendo macrófagos, neutrófilos, plaquetas y células endoteliales (68), en respuesta a la endotoxina y está considerado como uno de los potenciales mediadores en el shock séptico. Entre sus efectos se incluyen: agregación plaquetaria, aumento de la permeabilidad vascular e hipotensión (184).

El aumento de los niveles plasmáticos de PAF se asocia a la lesión de la mucosa intestinal en modelos de isquemia-reperfusión (185), aunque el mecanismo por el cual el PAF produce este efecto no está aún aclarado. Una posible explicación sería un aumento de la migración de leucocitos, acción atribuida al PAF, que haría que estos secretaran oxidantes tóxicos que contribuirían al efecto deletéreo sobre la mucosa intestinal. Esto queda ulteriormente apoyado por el hallazgo de niveles aumentados de malondialdehído (MDA), un producto de peroxidación lipídica.

Es conocido el papel de los neutrófilos en el proceso inflamatorio que acontece durante la sepsis (178). Estas células se adhieren al endotelio vascular ocasionando microtrombosis y, además, pueden liberar una serie de mediadores que incluyen enzimas

como fosfolipasa A₂, peroxidasas y proteasas, y radicales libres de oxígeno. Estos mediadores, probablemente interrelacionados, consiguen aumentar la respuesta inflamatoria y, así, provocar una mayor lesión tisular.

Por otro lado, el óxido nítrico (NO), un radical simple y relativamente inestable en condiciones aerobias, ha sido recientemente identificado como un potente mediador pleiotrópico (186). Sus acciones principales se asemejan a las del TNF α , interleuquina 1 (IL-1) y otras citoquinas en los diversos tejidos del organismo. Aunque nuestros conocimientos acerca de sus funciones son aún incompletos, se sabe que este radical es responsable de la actividad del factor relajante endotelial derivado del endotelio (EDRF), actúa como neurotransmisor, es antiagregante plaquetario y es una de las principales moléculas implicadas en la defensa de las células inmunes frente a parásitos, bacterias intracelulares y células tumorales (186,187). A nivel gástrico, el NO está implicado en la regulación del tono basal de la microcirculación mucosa, durante los estados de reposo y secreción de ácido (188), y se ha encontrado que la inhibición de la síntesis de NO reduce el flujo sanguíneo gástrico. Por otra parte, el NO es un mediador de la vasodilatación en la mucosa gástrica durante la secreción ácida. Por todo ello, se deduce que el NO endógeno podría contribuir en la defensa de la mucosa gástrica frente a estímulos que provoquen ulceración de la misma (139).

En condiciones fisiológicas, el NO ejerce sus acciones mediante la activación de la fracción soluble de la guanilato ciclasa, con el consiguiente aumento en la concentración del segundo mensajero guanosina 3'5' monofosfato cíclico (cGMP), que puede ser incluso utilizado como marcador de la actividad de NO (186). Las citoquinas pueden inducir la expresión de una isoforma, diferente de la habitual, de la enzima sintetasa de NO en diversos tipos celulares (186). La gran actividad de dicha enzima, origina un incremento

masivo en la producción de NO, el cual puede actuar independientemente de GMPc, bien sea aumentando la ribosilación de ADP en las proteínas plaquetarias, inactivando las enzimas mitocondriales con núcleo de sulfuro de hierro, o dañando el DNA (189). El NO puede combinarse además con RLO, también producidos por células inmunes activadas, dando lugar a peroxinitrito de gran poder oxidante (190).

Aunque no se ha demostrado, hasta el momento, ninguna relación del monóxido de carbono (CO) en la fisiopatología del ulcus de estrés, es posible que este gas actúe como mediador en las lesiones agudas de la mucosa gástrica, producidas durante la sepsis. Por un lado, al CO se le han atribuido funciones como favorecedor de la agregación plaquetaria y de la relajación del endotelio, probablemente mediadas por la activación de la guanilato ciclasa (191). Además pudiera tener un origen endógeno a partir de la peroxidación de lípidos de membrana (192), involucrando, por tanto, a los radicales libres de oxígeno en la mediación del daño mucoso.

A pesar del potente efecto de la endotoxina sobre los neutrófilos, es muy probable que las células iniciales efectoras que provocan la lesión orgánica, inducida a través de la endotoxina, sean los macrófagos de los tejidos (193). Esta célula produce numerosos mediadores de la inflamación, entre los que se incluyen los metabolitos del ácido araquidónico, bien a través de la vía de la ciclooxigenasa, sintetizándose las diferentes prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX), o bien por la vía de la lipooxigenasa, produciéndose leucotrienos (LT) (48). Este efecto del LPS podría estar mediado por la producción de citoquinas (194), pudiendo tener alguno de estos metabolitos cierta capacidad para modular, a su vez, la producción de citoquinas (185).

Las prostaglandinas, producidas por la mucosa gástrica (176), estimulan la producción de moco y bicarbonato, y modulan la producción de ácido y el flujo sanguíneo

del estómago (176,177), mostrándose beneficiosas en las lesiones gástricas secundarias a sepsis (195).

Otros metabolitos del ácido araquidónico ejercen acciones distintas sobre la mucosa gástrica. Se sabe que tanto tromboxano A₂ (TXA₂), como leucotrieno B₄ (LTB₄) favorecen la lesión (33,181), aunque no está totalmente definido este mecanismo.

Cada vez se concede mayor importancia a la fosfolipasa A₂ (PLA₂) en el curso de la respuesta inflamatoria que se produce durante la sepsis (196). La PLA₂ es un enzima regulador de la generación de un grupo de lípidos, biológicamente activos, denominados metabolitos del ácido araquidónico, con importantes implicaciones en los estados de sepsis (33). La implicación de PLA₂ en la patogenia del ulcus de estrés no está clara. Se ha demostrado, en un modelo experimental en ratas (185), que la inhibición de PLA₂ evita la lesión mucosa asociada a isquemia intestinal y que eso está mediado, en parte, por productos resultantes de la activación de PLA₂ distintos a los metabolitos del ácido araquidónico. Por otro lado, Fisher y cols. (197) demostraron, experimentalmente, que un inhibidor competitivo de PLA₂ disminuye la degradación de fosfatidilcolina (PC) del pulmón, y quizás esto mismo pudiera suceder a nivel de la PC del "surfactante gástrico".

4- Descenso del pH_i.

El pH gástrico intramucoso (pH_i), medido por tonometría, es un índice de perfusión esplácnica. Valores bajos de pH_i se correlacionan con un inadecuado aporte de oxígeno al territorio esplácnico y que conducirá a un acidosis regional. La acidosis intramucosa se asocia a un peor pronóstico y aparición de fallo multiorgánico en pacientes sépticos.

Existen evidencias en modelos experimentales que las úlceras de estrés asociadas al shock hemorrágico, son secundarias a un descenso importante del pHi como consecuencia de una retrodifusión de H^+ (198).

Por otra parte, descensos en el pHi han sido encontrados en pacientes de cuidados intensivos que habían sufrido formación de úlceras y sangrado y también durante el shock hemorrágico experimental (198,199).

Tratamiento del ulcus de estrés

La profilaxis incluye el control de la situación hemodinámica en los estados de shock, el tratamiento adecuado de las complicaciones, el uso de fármacos vasoactivos, la compensación del equilibrio ácido-básico, el drenaje quirúrgico de los focos sépticos y la administración de antibióticos adecuados.

El tratamiento preventivo del ulcus de estrés se basa en tres premisas fundamentales:

1- La morbi-mortalidad asociada a este tipo de lesiones, es significativa.

2- Se conocen los factores predisponentes que actúan favoreciendo el desarrollo del ulcus de estrés y, por tanto, se tiene un mejor conocimiento de la población a la que se debe aplicar esta profilaxis.

3- El objetivo del tratamiento médico está dirigido a disminuir la acidez gástrica y el aporte sanguíneo de la mucosa, inhibir la acción de la pepsina, mejorar la agregación plaquetaria y fortalecer los mecanismos de defensa de la mucosa gástrica (200).

Lograr la alcalinización gástrica es un objetivo importante, ya que el pH tiene una influencia decisiva en la agregación plaquetaria. Un pH menor de 6,5 favorece el sangrado recurrente por redispersión de la trombina primaria (201). Al

mismo tiempo, la pepsina pierde su actividad proteolítica en condiciones de alcalinidad. Los fármacos utilizados incluyen: antiácidos, H₂ antagonistas, pirenzepina, secretina, somatostatina y, recientemente, omeprazol.

ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES H₂ Y ANTIACIDOS

Actualmente, los antiácidos y los antagonistas H₂ son los agentes más contrastados en la profilaxis de las úlceras de estrés (202). El objetivo es conseguir un pH gástrico igual o superior a 4, el cual es recomendado para conseguir un resultado óptimo en la prevención de estas lesiones (203).

Clásicamente, los antagonistas de los receptores de histamina tipo H₂ fueron ampliamente aceptados como agentes para prevenir el ulcus de estrés (204,205). No obstante, se observó que estos fármacos tienen una limitada eficacia, hecho que se atribuye a que sólo se alcanza una completa y duradera supresión ácida en un bajo porcentaje de pacientes (200). La completa supresión puede alcanzarse con el uso de omeprazol, una sustancia que probablemente juegue un papel importante, en el futuro, en el tratamiento del sangrado del tracto gastrointestinal superior (206). Por otra parte, con la combinación de estos fármacos se consigue una mejor supresión del ácido (207). De todas formas, cuando se observó, en estudios prospectivos, que estos fármacos fracasaban a la hora de reducir el sangrado y que la profilaxis, con ellos, aumentaba la morbimortalidad por la existencia de infecciones nosocomiales (208), se prestó más atención a la fisiopatología de estas lesiones. Parece que el jugo gástrico es sólo un cofactor en el desarrollo del ulcus de estrés y que el estrés no induce una hipersecreción de ácido, con excepción de pacientes con lesiones intracraneales (209). De todas formas, el uso de estos fármacos continúa aplicándose en el ulcus de estrés, y hay autores que recomiendan el uso en infusión continua para mantener unos niveles plasmáticos adecuados y así obtener un pH gástrico mayor de 4 (210,211) .

SUCRALFATO

El sucralfato es una sal básica de aluminio no absorbible, con múltiples mecanismos de acción (212): actúa como un amortiguador frente a iones locales de H_2 , estimula la secreción de moco y bicarbonato y a la vez, aumenta la capacidad amortiguadora de la capa de moco. La reparación de la mucosa está favorecida por una mejor microvascularización y aumento en la síntesis de prostaglandinas y factor de crecimiento epidérmico. El sucralfato protege a la mucosa gástrica del daño producido experimentalmente, dificulta el desarrollo de la hemorragia por úlceras de estrés y puede curar úlceras pépticas (213). Este fármaco no tiene acción sobre el pH y por ello podría tener un efecto beneficioso al prevenir la translocación bacteriana (214). La frecuencia de neumonías retrógradas por bacterias Gram negativas (10%) es menor que la que se encuentran con otros tipos de tratamiento preventivos (215).

Eddleston y cols. (216) en un estudio randomizado demostraron que el uso de sucralfato reduce un 40%, aproximadamente, la frecuencia de úlcus de estrés en los tres primeros días en pacientes intubados en unidades de cuidados intensivos.

PROSTAGLANDINAS

Como ya se comentó anteriormente, las prostaglandinas, especialmente PGE_2 y sus análogos son inhibidores de la secreción gástrica y parecen ejercer un efecto citoprotector sobre la integridad de dicha mucosa (217). La PGE_2 estimula la secreción de moco y bicarbonato y aumenta el flujo sanguíneo de la mucosa (218).

Aunque la administración exógena de prostaglandinas es eficaz en la curación de las úlceras pépticas (219), su lugar en la profilaxis y tratamiento del úlcus de estrés no está aún totalmente definido (220).

ANTIMUSCARINICOS

La pirenzepina, es un fármaco anticolinérgico relativamente específico de los receptores muscarínicos del estómago (221) y se ha utilizado con eficacia en la profilaxis de la hemorragia del ulcus de estrés.

Su acción está en relación con una disminución de la secreción ácida (22), el aumento de secreción de moco y bicarbonato y con un aumento del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica.

SECRETINA

Produce un aumento en la secreción de bicarbonato y así aumenta el pH intragástrico y también produce una reducción del aporte sanguíneo a la mucosa (menor que la somatostatina). Distintos estudios realizados muestran que secretina y somatostatina tienen una eficacia casi idéntica, para sangrados moderados, en la hemostasia primaria (222). La ventaja que ofrece la secretina es que carece de los efectos secundarios de la somatostatina.

VASOPRESINA

La administración intravenosa de vasopresina ha sido propuesta por algunos autores como tratamiento del sangrado del tracto gastrointestinal alto, en las varices esofágicas (223), con eficacia contrastada. No obstante, su uso en el sangrado por ulcus de estrés no ha sido posible debido a sus efectos sobre el sistema cardiovascular (isquemia miocárdica, arritmias e infarto) (200).

ALOPURINOL

Recientemente, el alopurinol ha sido estudiado como un posible agente eficaz en la prevención de la úlcera de estrés (224). Así Flynn y cols. (183) encontraron, en un modelo experimental, que este agente inhibidor de la xantina oxidasa proporciona una profilaxis para el úlcus de estrés sin modificación del pH gástrico y se asocia con una migración celular precoz hacia la superficie de la glándula mucosa contribuyendo así al restablecimiento de la continuidad de la barrera mucosa, que es el mecanismo de defensa local más importante contra la agresión.

CIRUGIA

La necesidad de cirugía por estas lesiones ha disminuído de forma importante (225), afortunadamente, porque en aquellos pacientes que necesitan de cirugía los resultados son desastrosos con una mortalidad alta.

La cirugía consiste en practicar una resección del estómago total o subtotal, puesto que no se trata, como en el úlcus péptico, de evitar la secreción clorhidropéptica, sino de eliminar el origen de la hemorragia (164).

Por esta razón, la vagotomía se sigue de malos resultados, continuando la hemorragia en un elevado porcentaje de enfermos; en cualquier caso, su utilidad hay que buscarla en el efecto de los vasos submucosos, reduciendo la congestión venosa. De todas formas, no es una técnica adecuada para este tipo de úlceras (164).

La gastrectomía parcial presenta los mismos riesgos de la gastrectomía total (dehiscencia de las suturas), sin embargo proporciona peores resultados puesto que la recidiva de hemorragia es mucho más frecuente (164).

Por esto hay que insistir en el tratamiento profiláctico, y en que si ya se ha

· presentado la hemorragia, es preciso no demorar la intervención quirúrgica, si se observa que las medidas conservadoras no son capaces de estabilizar al paciente. Es obvio que si, además de hemorragia, se observan signos de perforación, como sucede con frecuencia en las úlceras de Cushing y Curling, es preciso realizar una resección gástrica.

Pentoxifilina

Recientemente, se ha demostrado que pentoxifilina (PTXF), una metilxantina inhibidor de la fosfodiesterasa, reduce el daño tisular en animales sépticos (226) y es capaz de mejorar tanto las manifestaciones hemodinámicas como la supervivencia en modelos experimentales de shock sépticos (227). La PTXF puede aumentar el flujo sanguíneo tisular, en estados de bajo flujo, mediante un efecto vasodilatador directo y también mejorando la deformabilidad de las células rojas (228). Esta propiedad de mantener la oxigenación tisular ha sido propuesta como el mecanismo por el que mejora la supervivencia de los modelos de shock hemorrágico tratados con PTXF (229).

Por otra parte, la PTXF se ha mostrado como un agente protector de las lesiones de la mucosa gástrica inducida por indometacina, en ratas, ejerciendo este efecto mediante la disminución de la adhesión de polimorfonucleares neutrófilos, sin relación con la síntesis de prostaglandinas o con una posible inhibición de la secreción de ácido (230).

Además, se ha visto que en situaciones de isquemia, como en la enfermedad vascular periférica, la PTXF es un agente que inhibe la síntesis de radicales libres (231), y aunque este efecto de PTXF no se ha demostrado que exista en la lesión mucosa secundaria a sepsis, quizás pudiera ocurrir, dado que existe la condición de hipoperfusión o isquemia.

Somatostatina

Recientemente se ha despertado un gran interés en la regulación neuroendocrina de las reacciones inflamatorias. El tetradecapéptido somatostatina (SS) fue aislado inicialmente del hipotálamo, pero identificado posteriormente en diferentes tipos celulares de origen nervioso o endocrino. Dicha hormona muestra, en general, una función inhibitoria (232) que afecta a diversos órganos y que incluye al sistema inmune (233).

La SS es capaz de influenciar la actividad fagocítica "in vitro" de los monocitos de rata (234), la migración de leucocitos humanos (235), y la producción de citoquinas por monocitos humanos (236), habiendo sido sugerida para esta hormona una actividad inmunomoduladora (235) y antiinflamatoria (237). A dicha actividad han sido atribuidas las propiedades "citoprotectoras" que muestra la SS en diversos modelos de lesión tisular aguda (238), incluyendo modelos de gastritis erosiva (239). Además, la SS se ha mostrado eficaz en el tratamiento de la hemorragia por gastritis erosiva en humanos (240). El efecto hemostático de SS en casos de sangrado por ulcus de estrés fue investigado en diversos estudios (241).

La somatostatina no sólo reduce la secreción de ácido, sino también el aporte sanguíneo al territorio esplácnico (242) y estimula la producción de moco (243).

En la mayoría de los estudios realizados, SS conlleva un mayor cese del sangrado (74-95%) que el uso de placebos o antagonistas de receptores H₂. No obstante, los resultados sobre la eficacia de SS en el sangrado por ulcus de estrés no están claros.

HIPOTESIS DE TRABAJO

En la fisiopatología de la gastritis erosiva secundaria a sepsis pueden jugar un papel importante alteraciones en la barrera mucosa gástrica, uno de cuyos componentes lipídicos fundamentales es la fosfatidilcolina. La somatostatina ha mostrado propiedades citoprotectoras sobre la mucosa gástrica y, por otro lado, la pentoxifilina ha logrado reducir el daño tisular en diversos modelos experimentales de sepsis. Por ello nos hemos planteado como objetivos iniciales de este trabajo:

1. Investigar la síntesis de fosfatidilcolina por la mucosa gástrica en un modelo de sepsis inducida por lipopolisacárido en ratas, así como las modificaciones introducidas por la administración posterior de pentoxifilina o somatostatina.
2. Investigar la posible implicación de los metabolitos del ácido araquidónico y de los radicales libres en el daño de la mucosa gástrica.

Por otro lado, aunque el óxido nítrico (NO) ejerce un papel protector de la mucosa en situaciones fisiológicas favoreciendo la vasodilatación, la producción local de cantidades importantes de NO podría jugar un papel importante en las alteraciones que se producen en la mucosa gástrica durante la sepsis. El NO parece ejercer parte de sus efectos por activación de la guanilato ciclasa y el consiguiente aumento de los niveles de GMPC. Recientemente, se ha demostrado que el monóxido de carbono (CO) puede actuar como mensajero intracelular, activa la fracción soluble de la guanilato ciclasa y comparte otras propiedades del NO.

Nuestro siguiente objetivo fue investigar un posible papel de la producción local de NO y CO en las alteraciones de la mucosa gástrica y además, estudiar las posibles modificaciones por somatostatina y pentoxifilina.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES

Se han utilizado ratas Wistar, macho, entre 250 y 300 gr. de peso, alimentadas con una dieta estándar suministrada por Panlab (Barcelona, España) y agua "ad libitum", y sometidas a un control automático de los ciclos de luz-obscuridad (12 horas de luz, de 8-20 horas y 12 horas de obscuridad) y de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$).

Todos los animales recibieron cuidados humanos y se siguieron siempre, estrictamente, las normas éticas en investigación con animales, dictadas por La Comunidad Europea.

DISEÑO EXPERIMENTAL

1- Grupos Experimentales

Tras haber mantenido a las ratas una noche en ayuno, a todas se les administró lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia Coli* 055:B5 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) (a una dosis de 10mg/kg de peso) por vía intraperitoneal. Tras 30 min. (10 ratas/grupo) ó 120 min. (10 ratas/grupo) de la administración del lipopolisacárido, las ratas se dividieron de manera aleatoria en tres grupos a los que se les administró, también por vía intraperitoneal, colina tritiada ($20 \mu\text{Ci}$ de [methyl- ^3H] colina), como marcador de la síntesis de fosfatidilcolina (PC), junto con uno de los siguientes compuestos:

- 1)- Suero salino (5 ml/kg)[Grupo LPS]
- 2)- Somatostatina (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 5 ml/kg..[Grupo Somatostatina]
- 3)- Pentoxifilina (45 mg/kg; 5 ml/kg). [Grupo Pentoxifilina]

2- Grupo control

Las ratas que fueron asignadas a este grupo se manipularon exactamente igual que las asignadas a los grupos experimentales, administrándoles suero salino en lugar de las sustancias mencionadas anteriormente.

A las dos horas de la administración del tratamiento, las ratas se anestesiaron y a continuación, los estómagos fueron extraídos, lavados y guardados congelados hasta el momento de la determinación de los siguientes parámetros:

- * Fosfatidilcolina (PC) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) en mucosa gástrica.
- * Contenido de metabolitos del ácido araquidónico prostaglandina E_2 (PGE₂), prostaciclina I_2 (PGI₂), tromboxano B_2 (TXB₂) y leucotrieno B_4 (LTB₄) en la mucosa gástrica.
- * Contenido de malondialdehído (MDA) en la mucosa gástrica, como índice de peroxidación lipídica.
- * Actividad mieloperoxidasa (MPO) en mucosa gástrica, como índice de infiltración leucocitaria
- * Guanosilmonofosfatocíclico (cGMP) en la mucosa gástrica.
- * Actividad de Nitrato Sintasa en la mucosa gástrica.
- * Contenido de $NO_2^- + NO_3^-$ en el lavado gástrico y en el plasma, como índice de la producción de óxido nítrico (NO).
- * Contenido de monóxido de carbono (CO) en el lavado gástrico y en el plasma.
- * Actividad de la Fosfolipasa A_2 en el tejido gástrico.
- * Producción de Somatostatina en el estómago.
- * Concentración de proteínas en la muestra de mucosa gástrica y en el líquido de lavado, para referir las anteriores determinaciones a éstas.

OBTENCION DE MUESTRAS

Las ratas fueron anestesiadas, a las dos horas de administrar la colina tritiada (150 ó 240 min. después de la administración de LPS), con ketamina (10 mg/kg; 2 ml/kg) inyectadas intraperitonealmente.

1- Obtención de lavado gástrico

Tras realizar la laparotomía, se disecó el estómago y posteriormente se ligó su salida a nivel del píloro. Tras seccionar la unión esófago-gástrica, se introdujo a través de ella un catéter de teflon del calibre 14 conectado a jeringa y así se realizó el lavado de la cavidad gástrica con 2 ml. de solución de NaCl al 0.9% (4°C). El líquido, que fue recuperado con la misma jeringa, se congeló a -80°C hasta la determinación de su contenido en $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, CO y proteínas.

2- Obtención de mucosa gástrica

Tras extirpar por completo el estómago, se abrió longitudinalmente a través de su curvatura menor y se realizó un raspado, con una cureta, de la mucosa gástrica, que se dividió en varios tubos y se almacenó congelada (-80°C) hasta el momento de la determinación de los distintos parámetros investigados.

DETERMINACION DE PC Y DPPC

Para la extracción de fosfatidilcolina, una muestra de mucosa se homogeneizó en cloroformo/metanol (2:1) a una dilución final 1/17. A continuación, la mezcla se equilibró a temperatura ambiente durante una hora y se filtró a un tubo de cristal con tapón esmerilado. El extracto crudo, se mezcló con 0.2 veces su volumen de solución de Folch,

y las dos fases de la mezcla se separaron por centrifugación. Tras aspirar la fase superior, se realizan tres lavados con UPS (50% del volumen original), centrifugando tras cada lavado y descartando la fase superior. Finalmente, la fase inferior y el remanente de la superior se convierten en una fase por adición de metanol, y la solución resultante se evaporó a vacío. El extracto seco se redisolvió, de nuevo con cloroformo/metanol, y se trasvasó a un vial de centelleo para la determinación de su radioactividad en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan como cpm/mg proteína.

Para separar la forma disaturada de la PC (DPPC), se hizo reaccionar la fracción completa de PC con tetróxido de osmio en tetracloruro de carbono, y las especies disaturadas de PC se separarán de las insaturadas por cromatografía en capa fina en placas de sílica gel impregnadas de ácido bórico, utilizando una mezcla de cloroformo/metanol/hidrocloreuro de amonio/H₂O (75:25:1:2 v/v) (244). Como control, se aplicaron directamente a la placa, diferentes cantidades de una solución estándar de DPPC. Para calcular la recuperación de especies disaturadas de la muestra, se repitió el procedimiento con muestras de PC saturada radioactiva. La recuperación fue del $79,5 \pm 6,2 \%$ (n=6).

OXIDO NITRICO

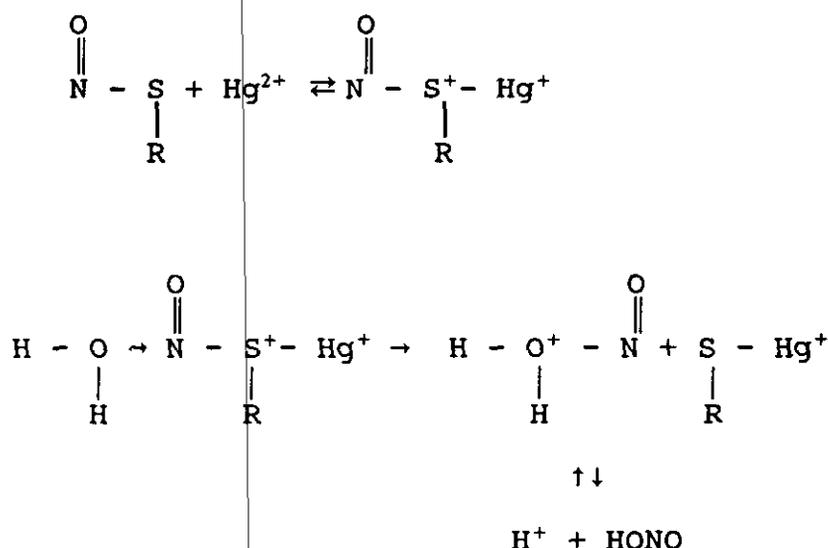
Se determinó como contenido de nitrito (NO₂⁻). Para ello, las muestras se desproteinizaron por adición de ácido sulfosalicílico e incubadas 30 minutos a 4°C. Tras centrifugación durante 20 minutos (12000 x g), se separó el sobrenadante y se incubó en presencia de nitrato reductasa para la reducción de NO₃⁻ a NO₂⁻ (245) A continuación, se añadió reactivo de Griess a todas las muestras y se midió su absorbancia a 546 nm (246), utilizando una solución de NaNO₂ como estándar.

ACTIVIDAD DE NITRATO SINTASA

Se determinó como la conversión de ^{14}C -Arginina en citrulina (247). Brevemente, muestras de tejido se homogeneizaron en un buffer conteniendo 10^{-2} mol/L Hepes, 0.32 mol/L sacarosa, 10^{-4} mol/L EDTA, 10^{-3} mol/L dithiothreitol, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 2 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina y 1 mg/ml phenylmethanesulfonilfluoride. A continuación, las muestras se centrifugaron a 100.000 x g, a 4°C , durante 20 minutos y una alícuota del sobrenadante se incubó en presencia del precursor radioactivo 30 minutos a 37°C y tras purificación por intercambio iónico en una columna de resina Dowes AG 8, se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

NITROSOTIOLES

Se determinó por el método de Saville (248). Este método se basa en la unión del catión Hg^{2+} al S formando un complejo susceptible al ataque nucleofílico por las moléculas de H_2O :



PEROXIDACION DE LIPIDOS

Se determinó como la producción de malondialdehído (MDA) mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) (249,250). Para ello, la muestra se homogeneizó en tampón fosfato salino (PBS). La suspensión resultante se centrifugó (3000 x g, 10 min.) y se tomó una alícuota del sobrenadante que, tras ser desproteinizada, se dejó reaccionar durante 12 horas con una solución conteniendo: ácido clorhídrico (0.25 mol/L), ácido tricloroacético (15%), ácido tiobarbitúrico (3 mmol/L) y 2-tetrabutiril-4-metilfenol (0.1%). Tras 12 horas de reacción se midió su absorbancia a 533 nm., utilizando como estándar 1-1-3-3-tetraetoxipropano.

GUANOSIL MONOFOSFATO CICLICO (GMPc)

Se midió mediante radioinmunoensayos específicos (RIA Kit NEN) (251). Brevemente, tras adición de isomethyl buthyl xantina (inhibidor de la fosfodiesterasa) el tejido se homogeneizó manualmente en un homogeneizador de cristal y a continuación se sonicó con un disruptor de ultrasonidos. Las proteínas se precipitaron y el nucleótido cíclico se extrajo con etanol (80% v/v). Tras centrifugación, el sobrenadante se separó en dos alícuotas que se transfirieron a tubos de RIA y se evaporaron a 37°C. Los residuos se reconstruyeron con buffer de radioinmunoensayo y se determinaron por RIA siguiendo las instrucciones específicas de cada Kit. La recuperación de [³H] GMPc fue de 97,6 ± 2,1% (n=6).

CONTENIDO DE MIELOPEROXIDASA

Se determinó por el método de Bradley (252) modificado. Para ello, una muestra de mucosa gástrica se homogeneizó en tampón fosfato (pH 6.0) y se centrifugó a 20.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en tampón fosfato con bromuro de hexadeciltrimetilamonio para eliminar la posible actividad de pseudoperoxidasa y solubilizar la mieloperoxidasa (MPO) unida a membrana. Esta suspensión se sonicó durante 20 segundos, y se congeló y descongeló tres veces. Una alícuota del sobrenadante final se mezcló con tampón fosfato, conteniendo dihidrocloruro de O-dianisidina y peróxido de hidrógeno, y se determinó su absorbancia a 460 nm.

DERIVADOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO

Se midieron mediante radioinmunoensayos específicos (RIA Kit Amersham). Tras extracción específica, todas las muestras se procesaron inmediatamente después de su obtención. Dada su inestabilidad, la PGI_2 se determinó como concentración de su metabolito estable la 6-ceto-PGF 1α . La PGE_2 , se convirtió en su derivado metil oximato.

PROTEINAS

Se realizó mediante un método colorimétrico descrito por Bradford (253). El fundamento de este método es la unión del Azul Brillante de Coomassie a las proteínas. Esta unión produce un desplazamiento de la absorción máxima del colorante de 465 a 595 nm. Se monitoriza la absorbancia de las muestras a esta última longitud de onda frente a una curva patrón conocida. El complejo proteína colorante tiene un alto coeficiente de extinción, lo que proporciona una gran sensibilidad en la medida de la proteína.

PRODUCCION DE CO

Para cuantificar la cantidad de CO formado, se añadió hemoglobina (Hb), que fija el CO, y se estimó la cantidad de carboxihemoglobina (COHb) (192). Para ello, se añadió Hb a la muestra y se esperó 1 minuto con el fin de asegurar la máxima unión de CO. A continuación, las muestras se diluyeron con tampón fosfato conteniendo ditionito sódico, se dejaron reaccionar 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó su absorbancia a 421 y 432 nm., utilizando como blanco una muestra conteniendo sólo tampón.

DETERMINACIÓN DE FOSFOLIPASA A₂ (PLA₂)

La actividad de PLA₂, se midió como liberación de ³H-araquidónico utilizando una suspensión de *Escherichia coli* marcada con ³H-araquidonato como sustrato (254). Tras homogeneización del tejido en buffer fosfato salino (PBS) conteniendo 0.1 mmol/l de phenylmethylsulfonylfluoride, alícuotas (200 µl) de las muestras se incubaron a 37° C durante 1 hora en un buffer conteniendo 0.1% Tritón x-100, 40 mmol Trizma base, 0.65 mmol/L ácido deoxicólico, 2 mmol/L CaCl₂ y 0.25 µci de la suspensión de *E. Coli* marcada, pH 7.5. La reacción se detuvo por adición de 2 ml de 2-propanol/n-heptano/1 mol/L H₂SO₄ (40:10:1). A continuación, se añadieron 2 ml de n-heptano y 3 ml de agua destilada para la formación de dos fases, y se determinó la radioactividad de la fase superior en un contador de centelleo líquido.

La actividad de PLA₂, se expresa como UI/mg proteína. Una unidad equivale al 1% de las cuentas totales.

RADIOIODACION Y DETERMINACION HORMONAL DE SOMATOSTATINA

Las medidas hormonales de somatostatina se determinaron utilizando un método radioinmunológico descrito por Yalow y Berson (255-257). Su fundamento se basa en una reacción de competición entre un antígeno marcado radioactivamente (hormona "caliente") y un antígeno no marcado (hormona "fría" contenida en la muestra) para unirse con una cantidad fija de anticuerpo específico para ellos.

RADIOINMUNOENSAYO DE SOMATOSTATINA.

El tampón usado para el RIA de somatostatina tuvo la siguiente composición: Na_2HPO_4 0.04 mol/l, NaCl 0.14mol/l y EDTA 0.025 mol/l, albúmina bovina 0.25%, pH=7.4

En tubos de 4 ml se pipetearon 100 μl de anticuerpo específico para somatostatina diluido, 500 μl de somatostatina marcada con Na^{125}I , 100 μl de muestra o bien de las soluciones estándar de somatostatina y se incubaron a 4° durante 48 horas.

La separación de la somatostatina libre de la ligada al anticuerpo se hizo añadiendo 1 ml de una suspensión de carbón-dextrano (0.25 % carbón y 0.025 % dextrano) en tampón fosfato, que contiene 0.9% NaCl, a todos los tubos excepto a los que sólo contuvieron la actividad total. Finalmente, se midió la radioactividad del precipitado en un contador de partículas gamma.

La sensibilidad del radioinmunoensayo fue de 0.03202 pg/tubo y la zona del mínimo error correspondió al rango de concentraciones comprendido entre 10 y 80 pg/tubo.

En todas las determinaciones hemos utilizado un anticuerpo específico propio (258) a una dilución final 1/56000.

ANALISIS ESTADISTICO

Se emplearon test estadísticos no paramétricos. Los resultados se expresaron como media \pm SEM. Para las comparaciones entre los grupos se empleó el test de Kruskal-Wallis de análisis de varianza (ANOVA) por rangos, seguido, en caso de dar significación, del test de Mann-Whitney para muestras independientes, con el fin de identificar el origen de las diferencias. Se han considerado significativas y muy significativas unas confianzas iguales o superiores al 95 % ($p < 0.05$) y 99 % ($p < 0.01$), respectivamente.

RESULTADOS

FOSFATIDILCOLINA

Para estudiar el efecto del LPS bacteriano sobre la síntesis de fosfatidilcolina (PC), por las células de la mucosa gástrica, se determinó la incorporación de la colina marcada ([Metil-³H]colina) en la PC extraída del tejido gástrico.

Como se observa en la figura 5, la administración de LPS indujo una disminución significativa de la incorporación de colina marcada a PC, respecto al grupo control, tanto a los 150 minutos (613.300 ± 60.663 vs 1225.50 ± 110.541 cpm/mg proteína, $p < 0.01$; $n=10$) como a los 240 minutos (498.778 ± 19.976 vs 1134.33 ± 119.778 cpm/mg proteína, $p < 0.01$; $n=9$) del tratamiento (Fig. 5; Tabla VIII)

Cuando se administró PTXF o SS a los 30 minutos del LPS estos efectos fueron bloqueados. Ambas sustancias, PTXF y SS, indujeron un aumento de la incorporación de colina marcada a PC (986.00 ± 148.507 vs 613.300 ± 60.663 cpm/mg proteína, $p < 0.01$; $n=10$. 1179.80 ± 204.758 vs 613.300 ± 60.663 cpm/mg proteína, $p < 0.01$; $n=10$, con PTXF y SS respectivamente). (Fig. 5; Tabla VIII)

El tratamiento con PTXF o SS a los 120 minutos de la administración del LPS también bloqueó el efecto de éste sobre la incorporación de colina marcada a PC de la mucosa gástrica (1054.00 ± 158.032 vs 498.778 ± 19.976 cpm/mg proteína, $p < 0.01$; $n=9$. 1075.22 ± 184.838 vs 498.778 ± 19.976 cpm/mg proteína, $p < 0.01$; $n=9$, con PTXF y SS respectivamente). (Fig. 5; Tabla VIII)

FOSFATIDILCOLINA (cpm/mg proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	1225.50 ± 110.541	1134.33 ± 119.778
LPS	613.30 ± 60.663 *	498.77 ± 19.976 *
LPS + PTXF	986.00 ± 148.507	1054.00 ± 158.032
LPS + SS	1179.80 ± 204.758	1075.22 ± 184.838

Tabla VIII. Contenido de fosfatidilcolina (PC) en la mucosa gástrica. Efecto del LPS y del tratamiento a los 30 y 120 minutos, con PTXF y SS.

* p < 0.01 vs. resto

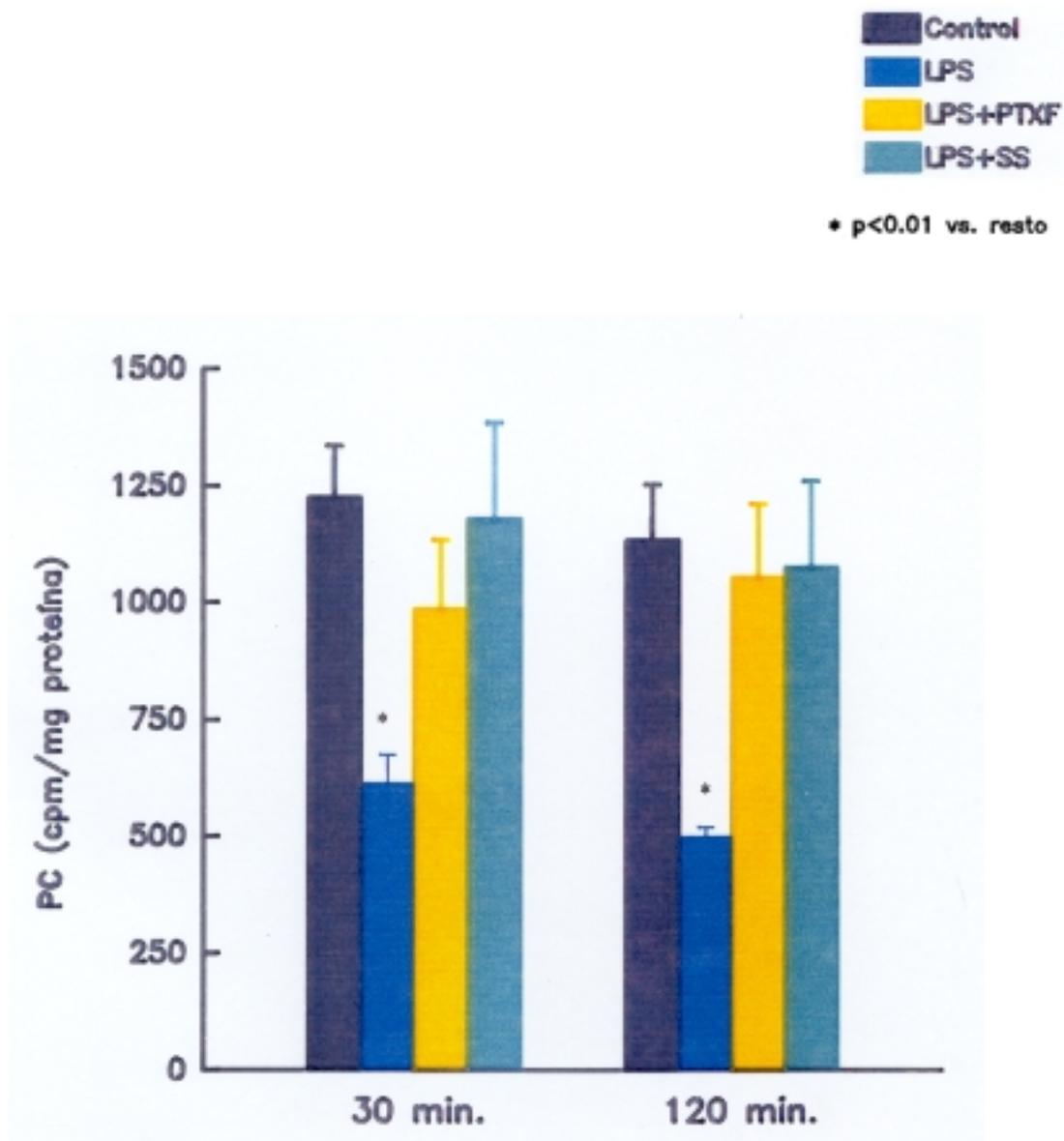


Fig 5. Contenido de fosfatidilcolina (PC) en la mucosa gástrica, medida como incorporación de colina marcada. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento tanto precoz como tardío con pentoxifilina (PTXF) o somatostatina (SS).

DIPALMITOILFOSFATIDILCOLINA

Dado que la fracción de PC de la barrera mucosa gástrica es rica en su forma saturada dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), decidimos estudiar a continuación si los cambios en el marcaje de PC reflejaban cambios en el marcaje de la forma saturada.

Como se observa en la figura, el LPS disminuyó la síntesis de DPPC por las células mucosas frente al grupo control a los 150 minutos (437.00 ± 46.358 vs 925.50 ± 85.531 cpm/mg proteína, $p < 0.01$; $n = 10$) y a los 240 minutos (366.00 ± 16.151 vs 871.667 ± 88.362 cpm/mg proteína, $p < 0.01$; $n = 9$). (Fig. 6; Tabla IX).

Este efecto fue bloqueado totalmente por PTXF en ambos grupos de tratamiento, precoz y tardío (760.00 ± 109.319 vs 437.00 ± 46.358 cpm/mg proteína, $p < 0.01$; $n = 10$. 796.44 ± 102.892 vs 366.00 ± 16.151 cpm/mg proteína, $p < 0.01$; $n = 9$, tras 30 o 120 minutos de la administración del LPS) sin encontrar diferencias significativas respecto al grupo control. (Fig. 6; Tabla IX)

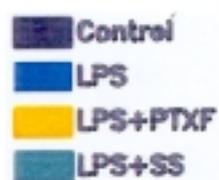
El tratamiento con SS produjo un efecto parecido al de PTXF tanto a los 150 como a los 240 minutos (880.50 ± 139.092 vs 437.00 ± 46.358 cpm/mg proteína, $p < 0.01$; $n = 10$. 827.889 ± 134.792 vs 366.00 ± 16.151 cpm/mg proteína, $p < 0.01$; $n = 9$, tratamiento precoz y tardío respectivamente). (Fig.6; Tabla IX)

DIPALMITOILFOSFATIDILCOLINA (cpm/mg proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	925.500 ± 85.531 *	871.667 ± 88.362 *
LPS	437.000 ± 46.358	366.000 ± 16.151
LPS + PTXF	760.000 ± 109.319	796.444 ± 102.892
LPS + SS	880.500 ± 139.092	827.889 ± 134.792

Tabla IX. Contenido de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) en la mucosa gástrica. Efecto de LPS y del tratamiento, precoz y tardío, con PTXF y SS respectivamente.

* $p < 0.01$ vs. resto



* p<0.01 VS. resto

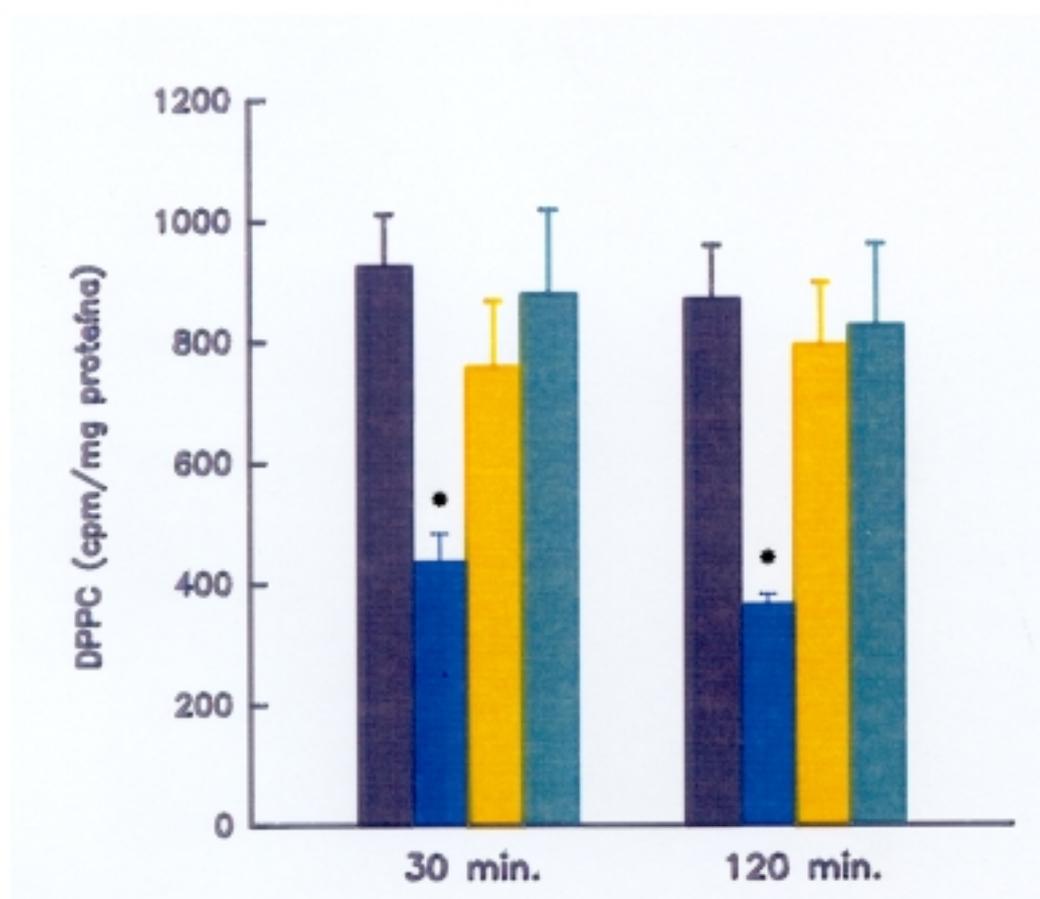


Fig 6. Contenido de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) en mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) o somatostatina (SS).

INFILTRACION LEUCOCITARIA

Para determinar el grado de infiltración leucocitaria, se midió el contenido de mieloperoxidasa (MPO) en el tejido gástrico.

La inyección intraperitoneal de LPS provocó un aumento significativo de MPO, tanto a los 150 minutos (1.253 ± 0.174 vs $0.462 \pm 0.112 \mu\text{UI}/\mu\text{g}$ proteína, $p < 0.01$; $n=10$) como a los 240 minutos (0.991 ± 0.119 vs $0.348 \pm 0.124 \mu\text{UI}/\mu\text{g}$ proteína, $p < 0.01$; $n=9$). La administración de PTXF, no modificó significativamente la actividad mieloperoxidasa respecto al grupo LPS, aún cuando los valores obtenidos fueron inferiores. Por el contrario, la administración de SS, tanto 30 como 120 minutos después del LPS, produjo un descenso significativo de la actividad mieloperoxidasa en el tejido gástrico respecto al grupo LPS (0.572 ± 0.122 vs $1.253 \pm 0.174 \mu\text{UI}/\mu\text{g}$ proteína, $p < 0.01$; $n=10$. 0.526 ± 0.107 vs $0.991 \pm 0.119 \mu\text{UI}/\mu\text{g}$ proteína, $p < 0.01$; $n=9$, a los 150 y 240 minutos respectivamente). (Fig. 7; Tabla X)

MIELOPEROXIDASA ($\mu\text{UI}/\mu\text{g}$ proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	0.4620 ± 0.11265	0.3488 ± 0.12459
LPS	$1.2530 \pm 0.17434 *$	$0.9911 \pm 0.11912 *$
LPS + PTXF	0.8360 ± 0.18430	0.6666 ± 0.11935
LPS + SS	0.5720 ± 0.12208	0.5266 ± 0.10737

Tabla X. Actividad mieloperoxidasa (MPO) en la mucosa gástrica. Efecto del LPS y del tratamiento con PTXF y SS tras 30 ó 120 min. de la inyección de LPS.

* $p < 0.01$ vs. control y vs. LPS + SS

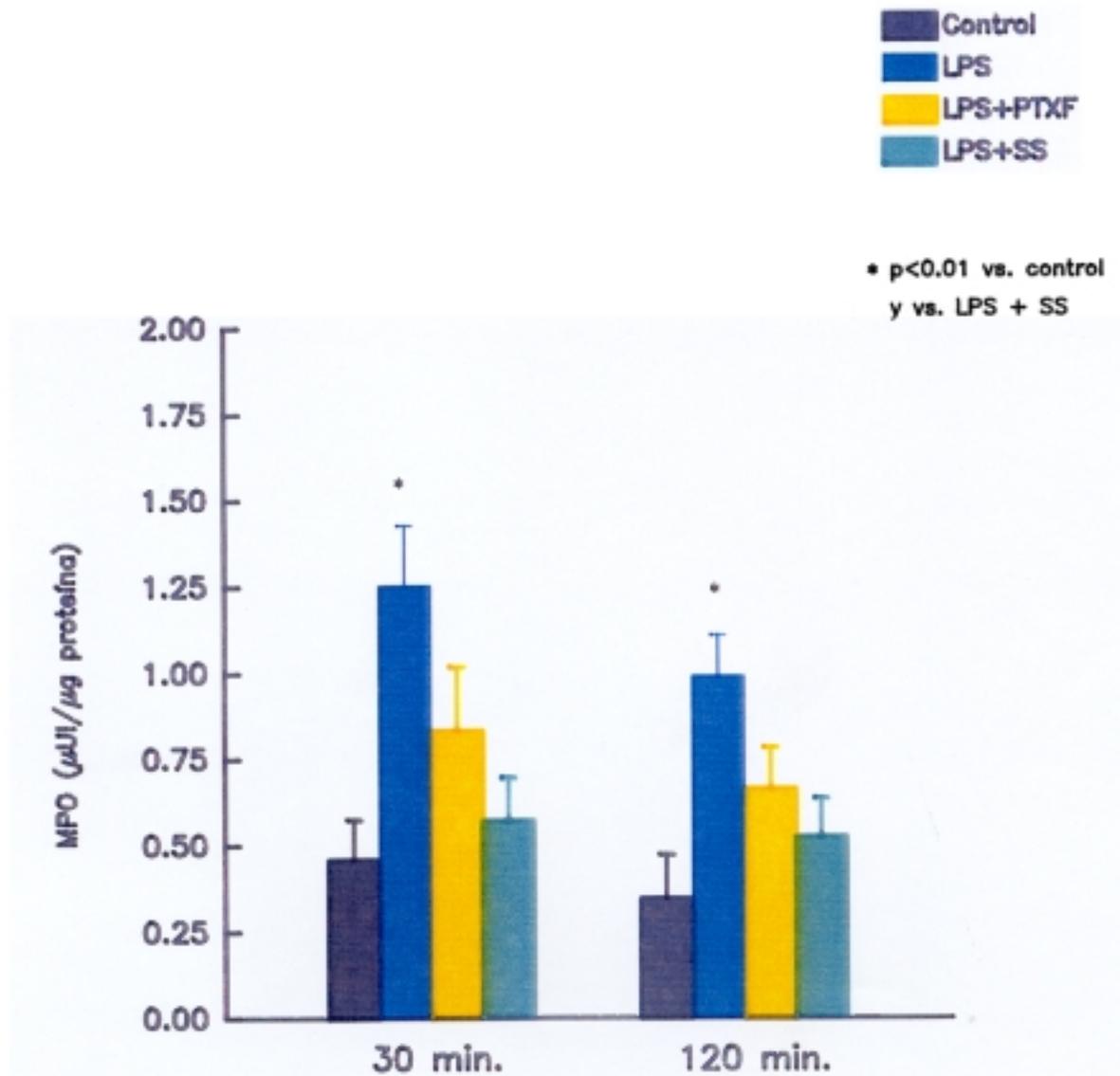


Fig 7. Actividad de mieloperoxidasa (MPO) en la mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento, a los 30 y 120 minutos, con pentoxifilina (PTXF) o somatostatina (SS) respectivamente.

Se sabe que la mucosa gástrica libera una serie de mediadores capaces de proteger o agravar la agresión tisular, entre ellos están los metabolitos del ácido araquidónico que se consideran implicados en la patogenia del ulcus de estrés.

A la prostaglandina E₂ (PGE₂) se le ha atribuído una función citoprotectora de la mucosa gástrica; por otra parte, la PGI₂ y el TXB₂, derivados también de la vía ciclooxigenasa, tienen papeles antagónicos. El tromboxano B₂ es el metabolito estable del TXA₂, tiene una acción vasoconstrictora y estimula la agregación plaquetaria. Por el contrario, la prostaglandina I₂ ejerce una acción vasodilatadora e inhibidora de la agregación plaquetaria.

PROSTAGLANDINA E₂

Ni la inyección intraperitoneal de LPS, ni la administración de PTXF o SS, modificaron significativamente la concentración de PGE₂ en la mucosa gástrica. (Fig. 8; Tabla XI).

PROSTAGLANDINA E₂ (ng/mg proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	5.4720 ± 0.61759	5.4277 ± 0.52408
LPS	4.8140 ± 0.37437	4.0866 ± 0.48123
LPS + PTXF	6.6970 ± 0.48239	5.4522 ± 0.75590
LPS + SS	5.4140 ± 0.39142	5.1766 ± 0.84032

Tabla XI. Contenido de prostaglandina E₂ (PGE₂) en la mucosa gástrica. Efecto del tratamiento con PTXF y SS tras 30 y 120 min de la inyección de LPS.

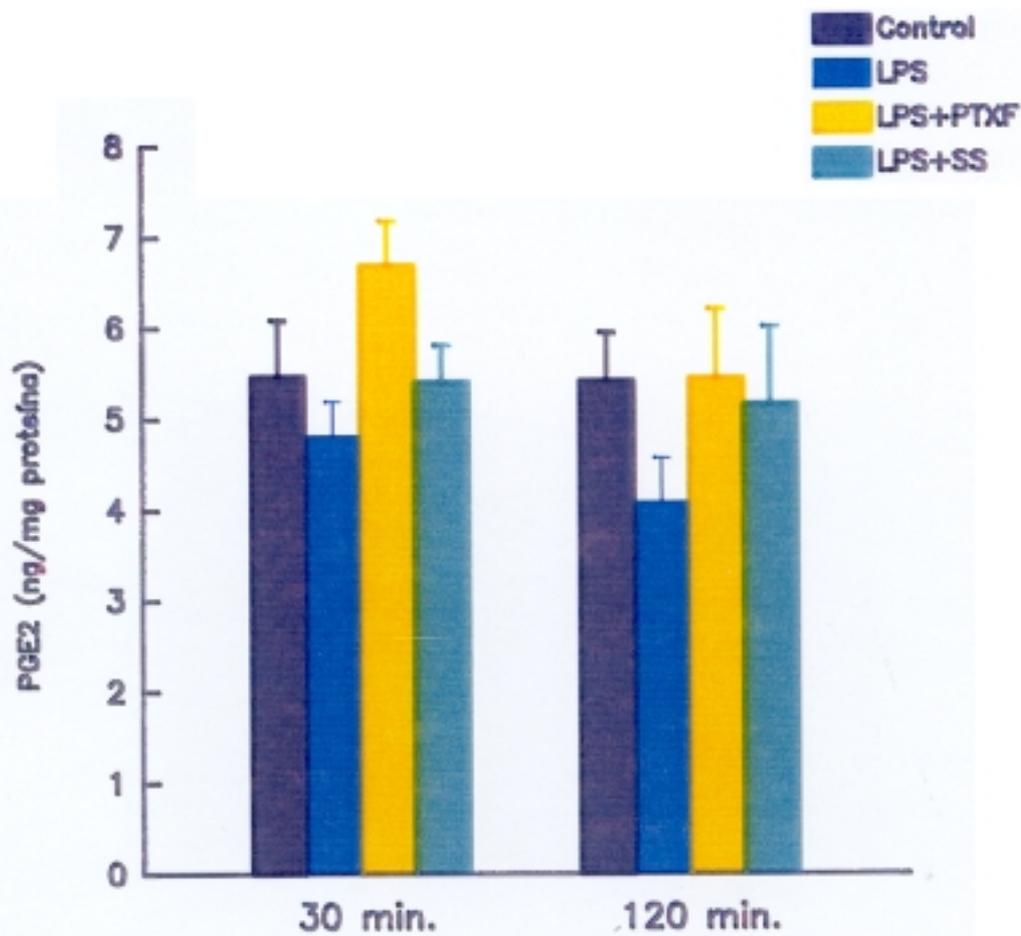


Fig 8. Contenido en prostaglandina E₂ (PGE₂) en la mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento con pentoxifilina (PTXF) o somatostatina (SS) a los 30 y 120 minutos respectivamente.

PROSTAGLANDINA I₂

La inyección intraperitoneal de LPS indujo un descenso significativo de la producción tisular gástrica de PGI₂, tanto a los 150 minutos (0.408 ± 0.030 vs 0.957 ± 0.054 ng/mg proteína, $p < 0.01$; $n = 10$) como a los 240 minutos (0.438 ± 0.049 vs 0.963 ± 0.119 ng/mg proteína, $p < 0.01$; $n = 9$). Este efecto fue bloqueado parcialmente, por PTXF, a los 150 minutos (0.790 ± 0.033 vs 0.408 ± 0.030 ng/mg proteína, $p < 0.01$; $n = 10$) y totalmente a los 240 minutos (0.786 ± 0.063 vs 0.438 ± 0.049 ng/mg proteína, $p < 0.01$; $n = 9$).

El tratamiento con SS, tanto 30 (0.716 ± 0.019 vs 0.408 ± 0.030 ng/mg proteína, $p < 0.01$; $n = 10$), como 120 min. (0.704 ± 0.025 vs 0.438 ± 0.049 ng/mg proteína, $p < 0.05$; $n = 9$), tras la administración del LPS revirtieron su efecto aunque no se alcanzaron los niveles del grupo control. (Fig. 9; Tabla XII).

PROSTAGLANDINA I₂ (ng/mg proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	0.9570 ± 0.05479 *	0.9633 ± 0.11948
LPS	0.4080 ± 0.03018 *	0.4388 ± 0.0492 **
LPS + PTXF	0.7900 ± 0.03320	0.7866 ± 0.06316
LPS + SS	0.7160 ± 0.01968	0.7044 ± 0.02577

Tabla XII. Contenido de prostaglandina I₂ (PGI₂) en la mucosa gástrica. Efecto del LPS y del tratamiento con PTXF o SS a los 30 min o 120 minutos de la inyección del LPS.

* p < 0.01 vs. resto

** p < 0.01 vs. control y LPS + PTXF

*** p < 0.05 vs. control y LPS

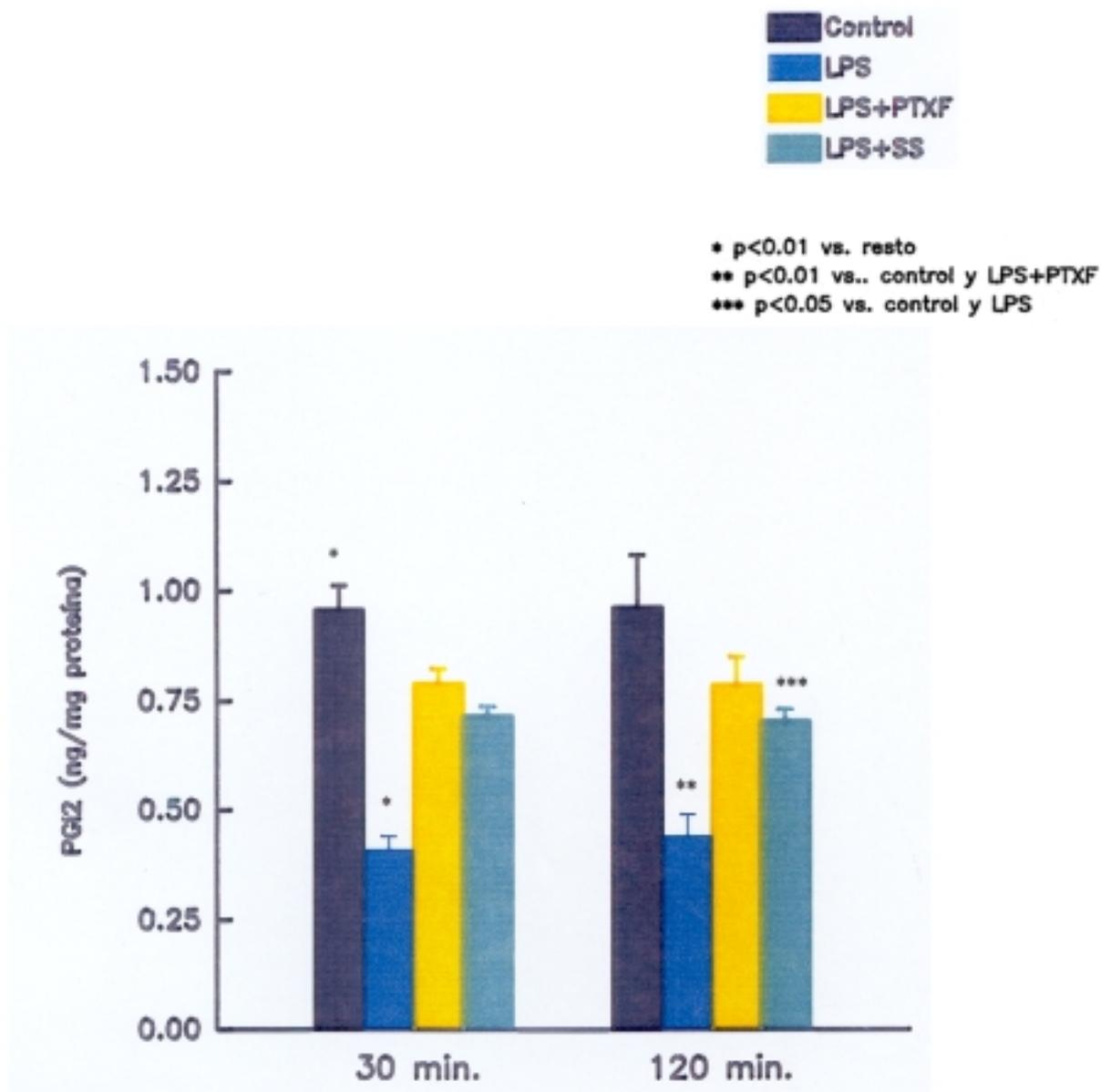


Fig 9. Contenido de prostaglandina I₂ (PGI₂) en la mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento con pentoxifilina (PTXF) o somatostatina (SS), precoz y tardío, respectivamente.

TROMBOXANO B₂

Como se ve en la figura 10, el LPS indujo un aumento significativo de la producción tisular de TXB₂ respecto al grupo control, tanto a los 150 (0.769 ± 0.049 vs 0.416 ± 0.019 ng/mg proteína, $p < 0.01$; $n=10$) como a los 240 minutos (0.946 ± 0.056 vs 0.467 ± 0.039 ng/mg proteína, $p < 0.01$; $n=9$). El tratamiento con PTXF redujo, significativamente, los efectos del LPS (0.580 ± 0.031 vs 0.769 ± 0.049 ng/mg proteína, $p < 0.01$; $n=10$. 0.580 ± 0.055 vs 0.946 ± 0.056 ng/mg proteína, $p < 0.01$; $n=9$, con tratamiento precoz y tardío respectivamente), aunque el bloqueo observado a los 30 minutos de la inyección del LPS fue parcial, encontrando unos valores de TXB₂ estadísticamente superiores a los del grupo control (0.580 ± 0.031 vs 0.416 ± 0.019 ng/mg proteína, $p < 0.01$; $n=10$) (Fig. 10; Tabla XIII).

También el tratamiento con SS revirtió totalmente el efecto del LPS tanto a los 150 (0.376 ± 0.015 vs 0.769 ± 0.049 ng/mg proteína, $p < 0.01$; $n=10$) como a los 240 minutos (0.402 ± 0.012 vs 0.946 ± 0.056 ng/mg proteína, $p < 0.01$; $n=9$), siendo este efecto mejor que el observado con PTXF, existiendo diferencias significativas entre ambas sustancias tanto a los 150 como a los 240 minutos (0.376 ± 0.015 vs 0.580 ± 0.031 ng/mg proteína, $p < 0.01$; 0.402 ± 0.012 vs 0.580 ± 0.055 ng/mg proteína, $p < 0.05$, con tratamiento precoz y tardío respectivamente).

TROMBOXANO B2 (ng/mg proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	0.4160 ± 0.01990	0.4677 ± 0.03936
LPS	0.7690 ± 0.04954 *	0.9466 ± 0.05610 *
LPS + PTXF	0.5800 ± 0.03183 *	0.5800 ± 0.05590
LPS + SS	0.3760 ± 0.01529	0.4022 ± 0.0124 **

Tabla XIII. Contenido de tromboxano B2 (TXB2) en la mucosa gástrica. Efecto de PTXF y SS tras 30 min. o 120 min. de la inyección intraperitoneal de LPS.

* p < 0.01 vs. resto

** p < 0.05 vs. LPS + PTXF

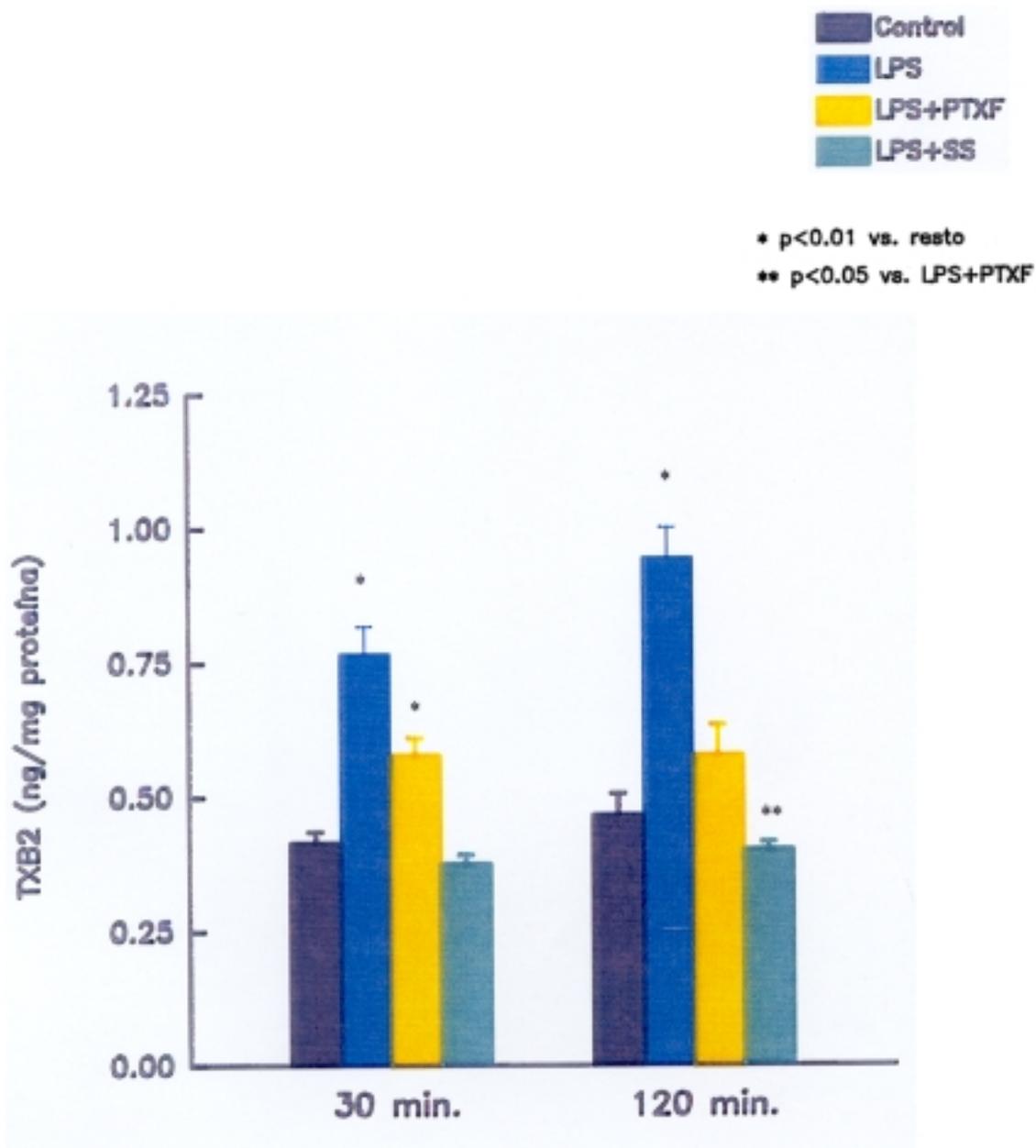


Fig 10. Contenido de tromboxano B₂ (TXB₂) en mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

LEUCOTRIENO B₄

El ácido araquidónico puede ser metabolizado por vías alternativas a la de la ciclooxigenasa, incluyendo la vía de la lipooxigenasa. Dada la importancia atribuída de los leucotrienos en la patogenia del ulcus de estrés, consistente en favorecer el daño sobre la mucosa gástrica (quizás estimulando la producción de RLO y facilitando la actividad quimiotáctica y de adhesión de los neutrófilos), hemos estudiado si el LPS modificaba los niveles de LTB₄ en la mucosa gástrica.

La inyección intraperitoneal de LPS indujo un aumento significativo de LTB₄ respecto a los grupos control, tanto a los 150 (124.609 ± 12.404 vs 58.406 ± 4.179 pg/mg proteína, p < 0.01; n = 10), como a los 240 minutos (156.854 ± 8.909 vs 70.302 ± 5.086 pg/mg proteína, p < 0.01; n = 9). El tratamiento, precoz o tardío, tanto con PTXF (60.301 ± 3.546 vs 124.609 ± 12.404 pg/mg proteína, p < 0.01; n = 10. 61.454 ± 2.372 vs 156.854 ± 8.909 pg/mg proteína, p < 0.01; n = 9, a los 150 y 240 minutos respectivamente) como con SS (61.092 ± 6.635 vs 124.609 ± 12.404 pg/mg proteína, p < 0.01; n = 10. 61.432 ± 3.614 vs 156.854 ± 8.909 pg/mg proteína, p < 0.01; n = 9, tratamiento precoz o tardío respectivamente) revirtió totalmente el efecto observado con LPS. (Fig. 11; Tabla XIV)

LEUCOTRIENO B4 (pg/mg proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	58.406 ± 4.179	70.302 ± 5.086
LPS	124.609 ± 12.404 *	156.854 ± 8.909 *
LPS + PTXF	60.301 ± 3.546	61.454 ± 2.372
LPS + SS	61.092 ± 6.635	61.432 ± 3.614

Tabla XIV. Contenido de leucotrieno B4 (LTB4) en la mucosa gástrica a los 150 min. y 240 min. de la administración de LPS. Efecto del tratamiento precoz y tardío con PTXF y SS.

* p < 0.01 vs. resto

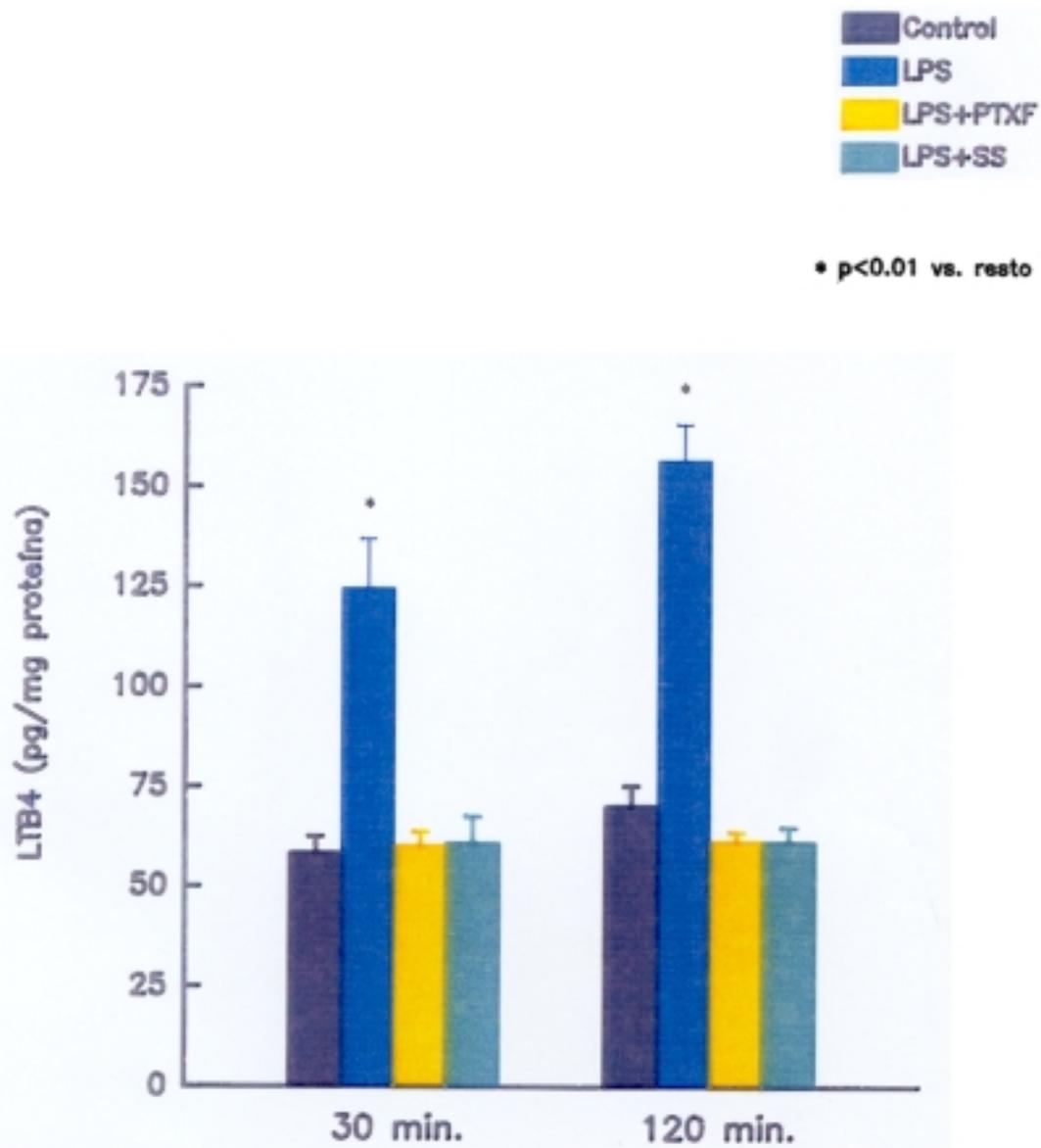


Fig 11. Contenido de leucotrieno B₄ (LTB₄) en mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

FOSFOLIPASA A₂

Se sabe que la fosfolipasa A₂ (PLA₂) ejerce un papel importante como mediadora de los fenómenos inflamatorios durante la sepsis. Además, el LPS bacteriano activa la PLA₂ de las membranas celulares y así se produce la hidrólisis de fosfolípidos que es un paso limitante en la liberación del ácido araquidónico. Por esto, hemos determinado la actividad de este enzima en la mucosa gástrica.

Tras la administración de LPS, se observó un aumento significativo de actividad PLA₂ respecto al grupo control tanto a los 150 como a los 240 minutos (0.850 ± 0.092 vs 0.285 ± 0.083 UI/mg proteína, $p < 0.01$; $n=5$. 0.900 ± 0.095 vs 0.342 ± 0.024 UI/mg proteína, $p < 0.01$; $n=5$, a los 150 min. y 240 minutos respectivamente).

La administración de PTXF indujo una disminución significativa de la actividad de este enzima en la mucosa gástrica, tanto 30 min. después de LPS (0.55 ± 0.020 vs 0.850 ± 0.092 UI/mg proteína, $p < 0.01$; $n=5$) como 120 minutos tras LPS (0.520 ± 0.025 vs 0.900 ± 0.095 UI/mg proteína, $p < 0.01$; $n=5$) aunque el bloqueo con esta sustancia fue parcial, obteniendo una actividad del enzima significativamente mayor que en el grupo control, (0.550 ± 0.020 vs 0.285 ± 0.083 UI/mg proteína, $p < 0.05$; $n=5$. 0.520 ± 0.025 vs 0.342 ± 0.024 UI/mg proteína, $p < 0.05$; $n=5$, tratamiento precoz y tardío respectivamente) (Fig. 12; Tabla XV). El tratamiento con SS, tanto 30 min. como 120 minutos después de la administración de LPS, revirtió este efecto totalmente (0.360 ± 0.093 vs 0.850 ± 0.092 UI/mg proteína, $p < 0.01$; $n=5$. 0.402 ± 0.036 vs 0.900 ± 0.095 UI/mg proteína, $p < 0.01$; $n=5$, tratamiento precoz y tardío respectivamente) (Fig. 12; Tabla XV)

FOSFOLIPASA A2 (UI/mg proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	0.2850 ± 0.0834	0.3425 ± 0.0245
LPS	0.8500 ± 0.0927 *	0.9000 ± 0.0958 *
LPS + PTXF	0.5500 ± 0.0201 **	0.5200 ± 0.0258 **
LPS + SS	0.3600 ± 0.0939	0.4025 ± 0.03695

Tabla XV. Actividad de la fosfolipasa A2 (PLA2) en la mucosa gástrica tras la administración de LPS y del tratamiento a los 30 min. y 120 min con PTXF y SS.

* $p < 0.01$ vs. resto

** $p < 0.05$ vs. control

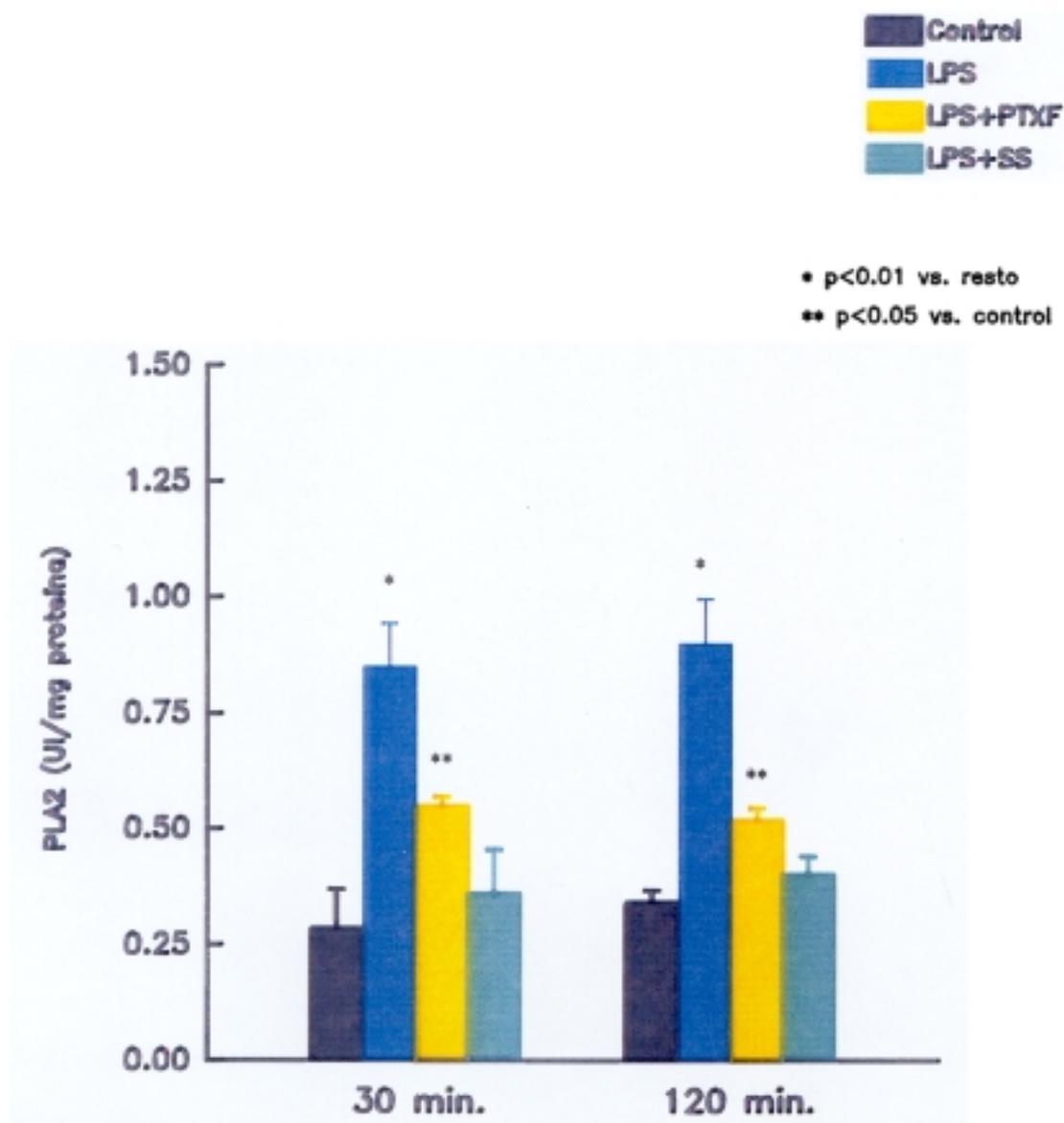


Fig 12. Actividad fosfolipasa A₂ (PLA₂) en mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

MALONDIALDEHIDO

Determinamos la producción de malondialdehído (MDA) en la mucosa gástrica como índice de peroxidación lipídica, acción atribuida a los radicales libres de oxígeno, producidos por leucocitos polimorfonucleares.

El LPS indujo un aumento significativo de la producción de MDA respecto al grupo control, tanto a los 150 minutos (11.565 ± 0.997 vs 4.884 ± 0.533 pmol/mg proteína, $p < 0.01$; $n=10$) como a los 240 minutos (11.508 ± 0.653 vs 5.132 ± 0.534 pmol/mg proteína, $p < 0.01$; $n=9$).

El tratamiento con PTXF y SS, tras 30 minutos de la administración de LPS, bloqueó totalmente el efecto de LPS (6.216 ± 0.579 vs 11.565 ± 0.997 pmol/mg proteína, $p < 0.01$; 5.467 ± 0.348 vs 11.565 ± 0.997 pmol/mg proteína, $p < 0.01$, tratamiento precoz con PTXF y SS respectivamente). Sin embargo, la administración tardía de PTXF o SS revirtió el efecto del LPS sólo parcialmente (7.047 ± 0.252 vs 11.508 ± 0.653 pmol/mg proteína, $p < 0.01$; $n=9$. 6.955 ± 0.439 vs 11.508 ± 0.653 pmol/mg proteína, $p < 0.01$; $n=9$, tratamiento tardío con PTXF y SS respectivamente), encontrando valores significativamente superiores a los controles, con ambas sustancias (7.047 ± 0.252 vs 5.132 ± 0.534 pmol/mg proteína, $p < 0.01$; $n=9$. 6.955 ± 0.439 vs 5.132 ± 0.534 pmol/mg proteína, $p < 0.05$; $n=9$, tratamiento tardío con PTXF y SS respectivamente). (Fig. 13; Tabla XVI).

MALONDIALDEHIDO (pmol/mg proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS (n=10)	120 MINUTOS (n=9)
Control	4.8840 ± 0.5331	5.1322 ± 0.5343
LPS	11.5650 ± 0.9970 *	11.5089 ± 0.6531 *
LPS + PTXF	6.2160 ± 0.5793	7.0477 ± 0.2527 **
LPS + SS	5.4670 ± 0.3483	6.9555 ± 0.4396 ***

Tabla XVI. Determinación de malondialdehído (MDA) en la mucosa gástrica tras la inyección intraperitoneal de LPS y después del tratamiento, precoz y tardío con PTXF y SS.

* p < 0.01 vs. resto

** p < 0.01 vs. control

*** p < 0.05 vs. control

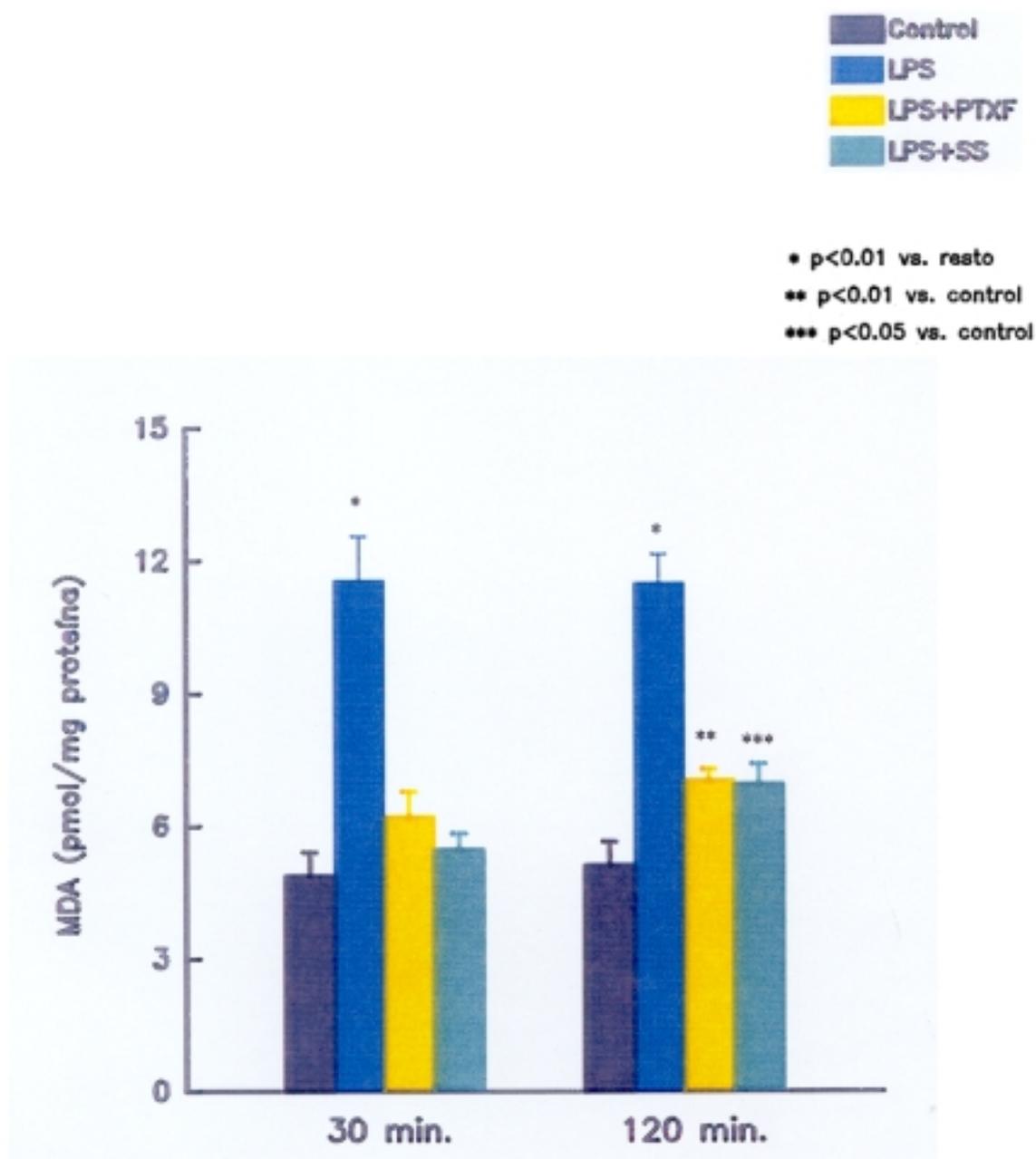


Fig 13. Contenido de malondialdehído (MDA) en mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

OXIDO NITRICO

Se determinó la concentración de óxido nítrico (NO) tanto en el líquido del lavado gástrico como en el plasma.

En el líquido del lavado gástrico, el LPS aumentó significativamente los niveles de NO tanto a los 150 minutos (5.112 ± 0.263 vs 1.168 ± 0.301 nmol/ml lavado, $p < 0.01$; $n=5$) como a los 240 minutos (6.13 ± 0.794 vs 2.064 ± 0.139 nmol/ml lavado, $p < 0.01$; $n=5$) respecto a los controles. (Fig. 14; Tabla XVII)

El tratamiento con PTXF a los 30 minutos de la administración de LPS bloqueó totalmente este efecto (2.152 ± 0.247 vs 5.112 ± 0.263 nmol/ml lavado, $p < 0.01$), pero la inyección de PTXF 120 minutos después del LPS bloqueó sólo parcialmente su efecto (4.278 ± 0.741 vs 6.134 ± 0.794 nmol/ml lavado, $p < 0.05$; $n=5$) (Fig 14; Tabla XVII). Sin embargo, la administración de SS tuvo un efecto bloqueante parcial como tratamiento precoz (2.428 ± 0.412 vs 5.112 ± 0.263 nmol/ml lavado, $p < 0.01$; $n=5$) y obtuvo un efecto de bloqueo total administrada como tratamiento tardío, 120 minutos tras LPS (3.420 ± 0.404 vs 6.134 ± 0.794 nmol/ml lavado, $p < 0.01$; $n=5$) (Fig. 14; Tabla XVII).

Por otra parte, la administración de LPS no indujo unas diferencias significativas en los niveles de NO plasmático a los 150 minutos y tampoco con el tratamiento, con PTXF o SS, se registraron alteraciones en dichos niveles. Sin embargo, a los 240 minutos sí obtuvimos un aumento significativo en las concentraciones de NO plasmáticas tras la inyección intraperitoneal de LPS respecto al grupo control (0.994 ± 0.173 vs 0.313 ± 0.053 nmol/ml plasma, $p < 0.01$). El tratamiento con PTXF revirtió parcialmente este efecto (0.570 ± 0.074 vs 0.994 ± 0.173 nmol/ml plasma, $p < 0.05$; $n=5$) mientras que con SS, tras 120 minutos del LPS, el bloqueo fue total (0.370 ± 0.048 vs 0.994 ± 0.173 nmol/ml plasma, $p < 0.01$; $n=5$) (Fig. 15; Tabla XVIII).

NO (LAVADO) (nmol/ ml lavado)

GRUPOS	30 MINUTOS (n=5)	120 MINUTOS (n=5)
Control	1.1680 ± 0.3011	2.0640 ± 0.1392
LPS	5.1120 ± 0.2635 *	6.1340 ± 0.7941 ***
LPS + PTXF	2.1520 ± 0.2479	4.2780 ± 0.7419 ****
LPS + SS	2.4280 ± 0.4124 **	3.4200 ± 0.4043

Tabla XVII. Concentración de óxido nítrico en el lavado gástrico en ratas. Efecto de la administración intraperitoneal de LPS y del tratamiento precoz (30 min.) y tardío (120 min.) con PTXF y SS.

* $p < 0.01$ vs. resto

** $p < 0.05$ vs. control

*** $p < 0.01$ vs. control y LPS + SS

$p < 0.05$ vs. LPS + PTXF

**** $p < 0.01$ vs. control

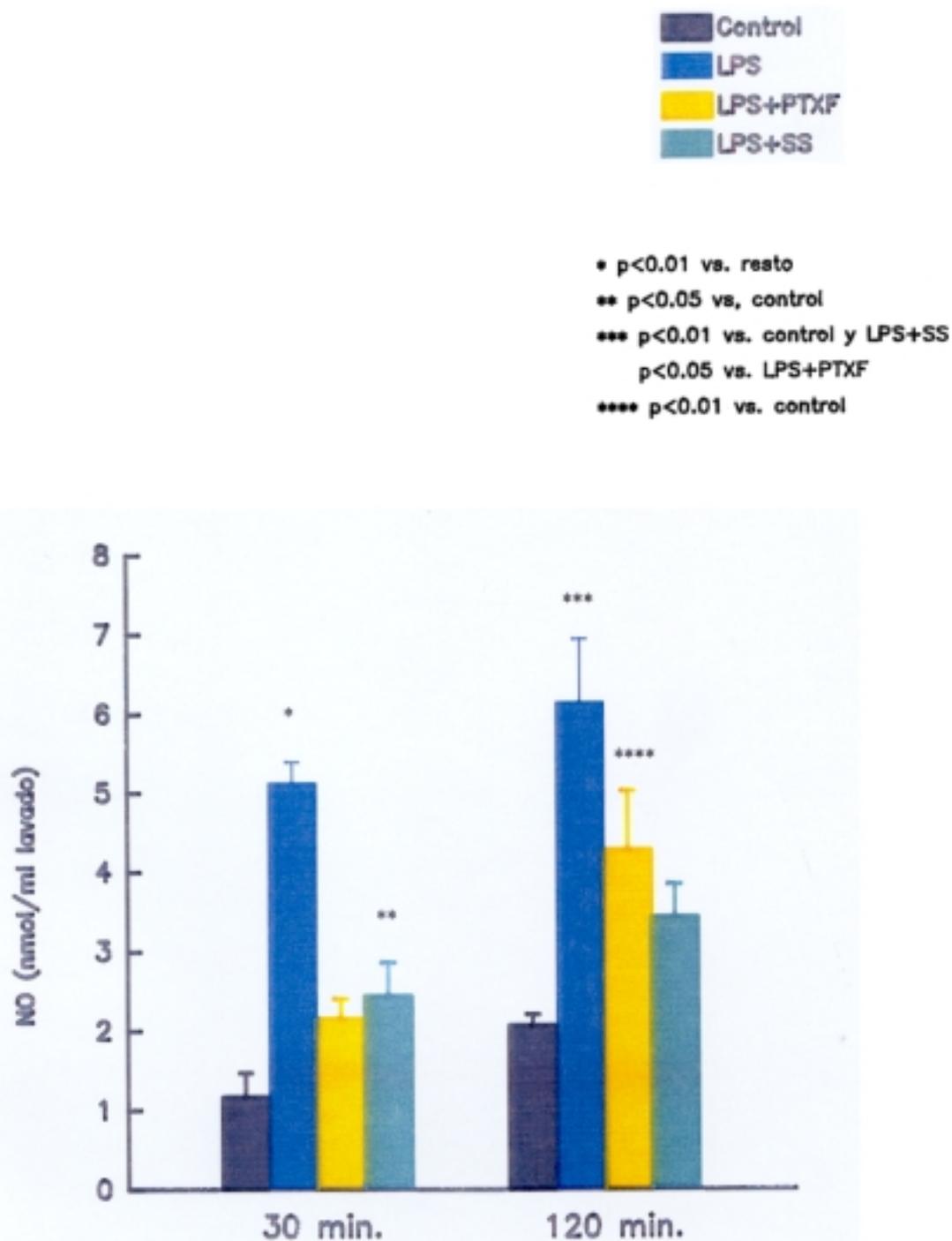


Fig 14. Concentración de nitrito (NO_2^-) + nitrato (NO_3^-) en el líquido del lavado gástrico. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

NO (PLASMA) (nmol/ml plasma)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	0.3163 ± 0.05384	0.3133 ± 0.0533
LPS	0.2913 ± 0.04319	0.9943 ± 0.1731 *
LPS + PTXF	0.2913 ± 0.05465	0.5700 ± 0.0749
LPS + SS	0.2643 ± 0.03937	0.3700 ± 0.0486

Tabla XVIII. Concentración de óxido nítrico plasmático. Efecto de LPS y tras el tratamiento a los 30 y 120 min. con PTXF y SS.

* $p < 0.01$ vs. control y LPS + SS

$p < 0.05$ vs. LPS + PTXF

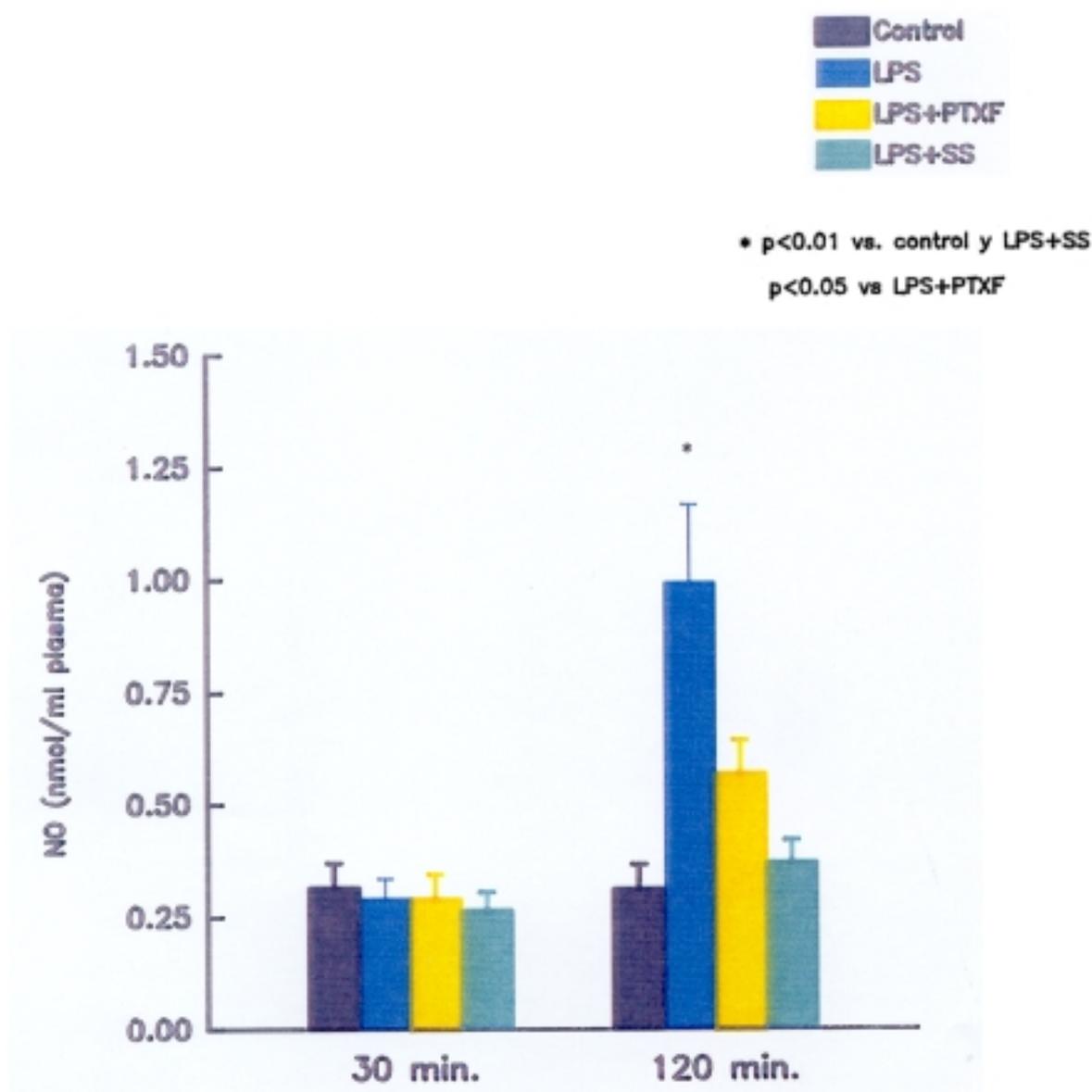


Fig 15. Concentración de nitrito (NO_2^-) + nitrato (NO_3^-) en plasma. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

Dado que hay autores que sugieren que una parte de las acciones biológicas del NO podrían estar mediadas no directamente através del NO libre sino mediante moléculas portadoras, nitrosotioles, y ya que no vimos diferencias en los niveles plasmáticos de NO_3^- ni de NO_2^- , determinamos la concentración de nitrosotioles con el fin de descartar que hubiese una mayor producción de NO que pasase desapercibida debido a encontrarse en esta forma biológica. Como hemos descrito para el NO, la administración de LPS indujo un aumento significativo de los niveles de nitrosotioles a los 240 minutos frente al grupo control (1.017 ± 0.173 vs 0.383 ± 0.017 nmol/ml, $p < 0.01$; $n=5$) no encontrando diferencias significativas a los 150 minutos. El tratamiento con SS 120 minutos después del LPS revirtió ese efecto (0.431 ± 0.033 vs 1.017 ± 0.173 nmol/ml, $p < 0.05$; $n=5$) no observando este efecto tras el tratamiento precoz con SS. (Fig. 16; Tabla XIX)

La administración, tanto de PTXF como de SS, 30 minutos después del LPS no indujo diferencias significativas en la producción de nitrosotioles por la mucosa gástrica.

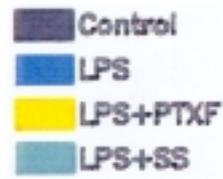
$\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- + \text{NITROSOTIOLES}$ (nmol/ml plasma)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	0.3833 ± 0.01764	0.3836 ± 0.0176
LPS	0.4716 ± 0.07824	$1.0173 \pm 0.1730 *$
LPS + PTXF	0.3750 ± 0.02352	0.6350 ± 0.0953
LPS + SS	0.3356 ± 0.06339	0.4316 ± 0.0335

Tabla XIX. Determinación de nitrosotioles en la mucosa gástrica. Efecto de LPS y del tratamiento precoz y tardío con PTXF y SS.

* $p < 0.01$ vs. control

$p < 0.05$ vs. LPS + SS



* $p < 0.01$ vs. control
 $p < 0.05$ vs LPS+SS

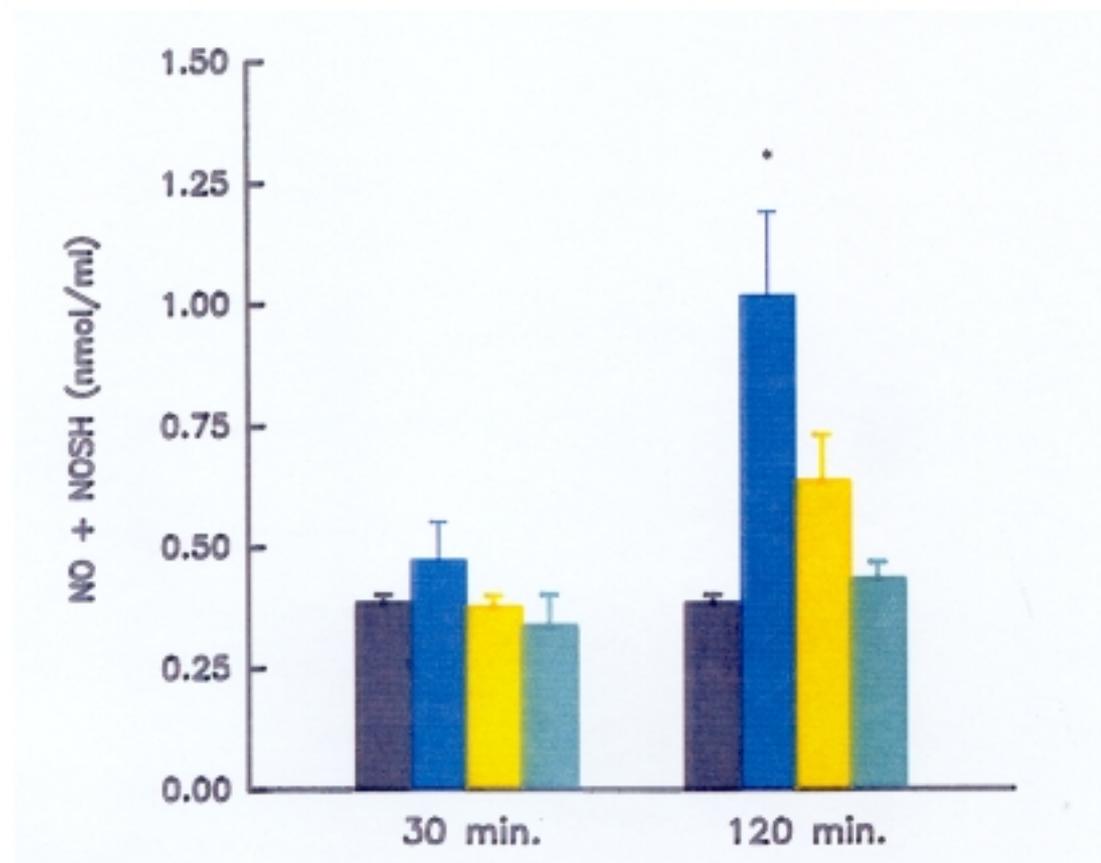


Fig 16. Contenido de óxido nítrico (NO) + nitrosioles (NOSH) en mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

NITRATO SINTASA

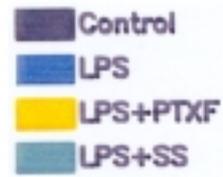
Cuando se administró LPS se produjo un aumento significativo de la actividad nitrato sintasa total, tanto de forma precoz como tardía, respecto a los controles (0.636 ± 0.057 vs 0.286 ± 0.055 pmol Arg/ μ g proteína, $p < 0.01$; $n=5$. 1.708 ± 0.321 vs 0.366 ± 0.010 pmol Arg/ μ g proteína, $p < 0.01$; $n=5$, a los 150 y 240 minutos respectivamente). La administración de PTXF indujo una disminución en la actividad de dicho enzima, observando valores similares a los control, tanto a los 150 (0.356 ± 0.082 vs 0.636 ± 0.057 pmol Arg/ μ g proteína, $p < 0.01$; $n=5$) como a los 240 minutos (0.820 ± 0.156 vs 1.708 ± 0.321 pmol Arg/ μ g proteína, $p < 0.01$; $n=5$). También el tratamiento con SS revirtió la actividad de nitrato sintasa total, tanto a los 150 (0.364 ± 0.042 vs 0.636 ± 0.057 pmol Arg/ μ g proteína, $p < 0.01$; $n=5$) como a los 240 minutos (0.670 ± 0.075 vs 1.708 ± 0.321 pmol Arg/ μ g proteína, $p < 0.01$; $n=5$). (Fig. 17; Tabla XX)

NO SINTASA TOTAL (pmol Arg/ μ g proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	0.2860 \pm 0.05510	0.3660 \pm 0.0103
LPS	0.6360 \pm 0.05776 *	1.7080 \pm 0.3212 *
LPS + PTXF	0.3560 \pm 0.08201	0.8200 \pm 0.1564
LPS + SS	0.3640 \pm 0.04297	0.6700 \pm 0.0752

Tabla XX. Determinación tisular de la actividad de nitrato sintasa total tras la administración de LPS y con el tratamiento a los 30 y 120 min con PTXF y SS.

* p < 0.01 vs. resto



* p<0.01 vs. resto

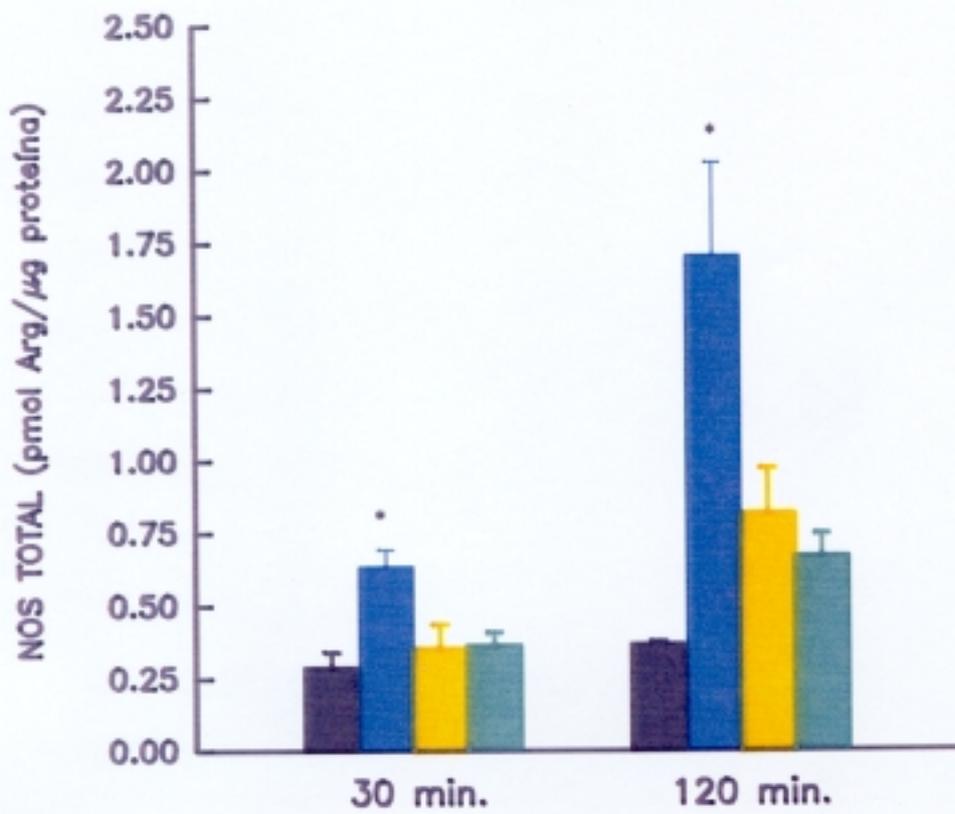


Fig 17. Actividad nitrato sintasa total (NOS total) en mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

Para determinar el grado de implicación de cada isoforma hemos estudiado por separado las actividades de nitrato sintasa inducible (Ca^{2+} dependiente) y constitutiva (Ca^{2+} independiente)

Hemos observado que tras la inyección de LPS se produjo un incremento significativo de la isoforma inducible, tanto a los 150 como a los 240 minutos frente a los grupos control (0.618 ± 0.024 vs 0.166 ± 0.018 pmol Arg/ μg proteína, $p < 0.01$; $n=5$. 1.418 ± 0.234 vs 0.206 ± 0.018 pmol Arg/ μg proteína, $p < 0.01$; $n=5$, tras 150 ó 240 minutos respectivamente). Cuando se administró PTXF se observó una disminución de la actividad nitrato sintasa inducible con ambas modalidades de tratamiento, precoz (0.258 ± 0.058 vs 0.618 ± 0.024 pmol Arg/ μg proteína, $p < 0.01$; $n=5$) y tardío (0.600 ± 0.053 vs 1.418 ± 0.234 pmol Arg/ μg proteína, $p < 0.01$; $n=5$) (Fig. 18; Tabla XXI); aunque con el tratamiento tardío el bloqueo fue sólo parcial, existiendo diferencias significativas con respecto al grupo control (0.600 ± 0.053 vs 0.206 ± 0.018 pmol Arg/ μg proteína, $p < 0.05$; $n=5$). (Fig. 18; Tabla XXI)

El tratamiento con SS, tanto precoz como tardío bloqueó sólo parcialmente la actividad nitrato sintasa inducible (0.298 ± 0.041 vs 0.618 ± 0.024 pmol Arg/ μg proteína, $p < 0.01$; $n=5$. 0.644 ± 0.026 vs 1.418 ± 0.234 pmol Arg/ μg proteína, $p < 0.01$; $n=5$, tratamiento precoz y tardío respectivamente), existiendo, en ambos casos, diferencias estadísticas respecto a los grupos control (0.298 ± 0.041 vs 0.166 ± 0.018 pmol Arg/ μg proteína, $p < 0.05$; $n=5$. 0.644 ± 0.026 vs 0.206 ± 0.018 pmol Arg/ μg proteína, $p < 0.05$; $n=5$, tras 30 ó 120 minutos de la inyección de LPS). (Fig. 18; Tabla XXI)

NO SINTASA INDUCIBLE (pmol Arg/ μ g proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	0.1660 \pm 0.01887	0.2060 \pm 0.0186
LPS	0.6180 \pm 0.02478 *	1.4180 \pm 0.2344 *
LPS + PTXF	0.2580 \pm 0.05860	0.6000 \pm 0.0532 **
LPS + SS	0.2980 \pm 0.0418 **	0.6440 \pm 0.0261 **

Tabla XXI. Actividad de nitrato sintasa inducible tras la administración de LPS y después del tratamiento con PTXF y SS a los 30 y 120 min.

* p < 0.01 vs. resto

** p < 0.05 vs. control

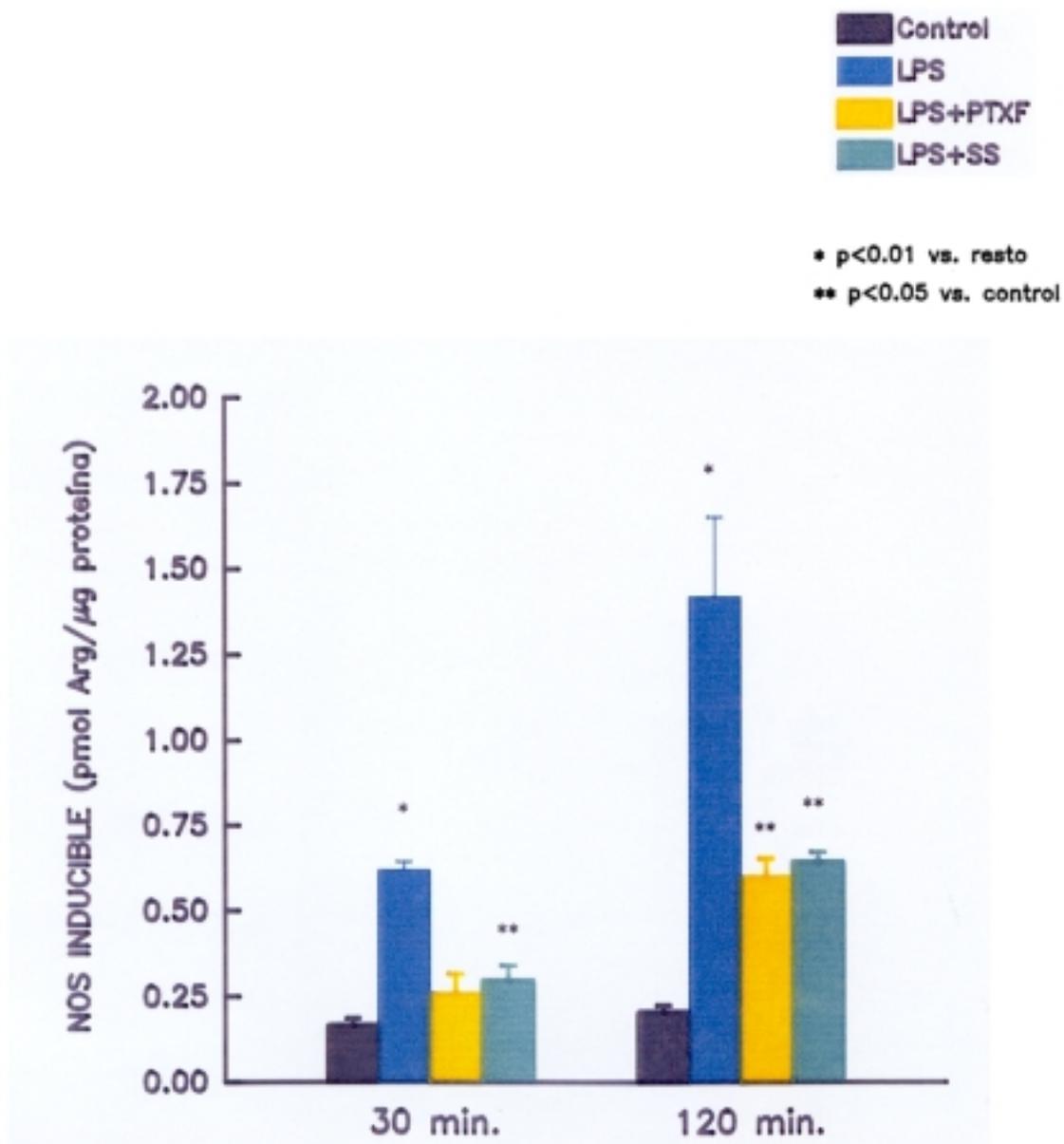


Fig 18. Actividad nitrato sintasa inducible (NOS inducible) en mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

En el caso de la nitrato sintasa constitutiva, aunque presentó una tendencia a ser mayor tras la administración de LPS, y a normalizarse con la administración de PTXF o SS, en ningún caso se observaron diferencias significativas. (Fig. 19; Tabla XXII)

NO SINTASA CONSTITUTIVA (pmol Arg/ μ g proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	0.3100 \pm 0.05495	0.3260 \pm 0.04020
LPS	0.3880 \pm 0.06560	0.4700 \pm 0.03912
LPS + PTXF	0.2880 \pm 0.10365	0.3680 \pm 0.04329
LPS + SS	0.3460 \pm 0.08010	0.3200 \pm 0.08432

Tabla XXII. Actividad de nitrato sintasa constitutiva. Efecto de LPS y del tratamiento precoz y tardío con PTXF y SS.

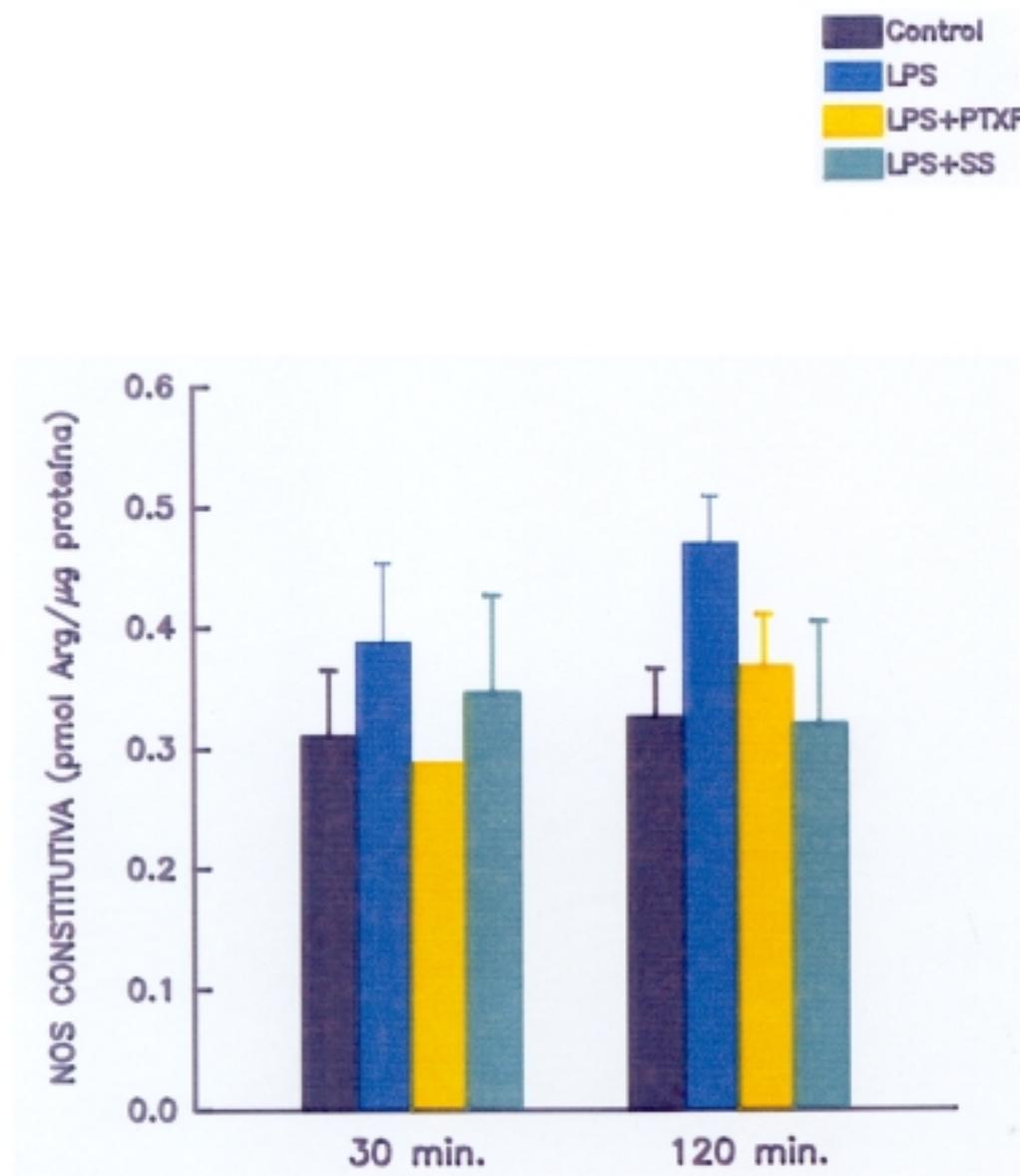


Fig 19. Actividad nitrato sintasa constitutiva (NOS constitutiva) en mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

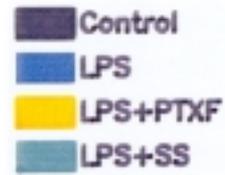
Cuando determinamos la actividad nitrato sintasa residual los efectos fueron semejantes. (Fig. 20; Tabla XXIII)

NO SINTASA RESIDUAL (pmol Arg/ μ g proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	0.0780 \pm 0.01655	0.1160 \pm 0.0067
LPS	0.1740 \pm 0.07332	0.1820 \pm 0.0455
LPS + PTXF	0.0900 \pm 0.01304	0.0980 \pm 0.0058 *
LPS + SS	0.0840 \pm 0.02112	0.0884 \pm 0.0055 *

Tabla XXIII. Determinación de la actividad de nitrato sintasa residual en la mucosa gástrica tras la inyección de LPS y con el tratamiento a los 30 ó 120 min. con PTXF y SS.

* p < 0.05 vs. LPS



• $p < 0.05$ vs. LP:

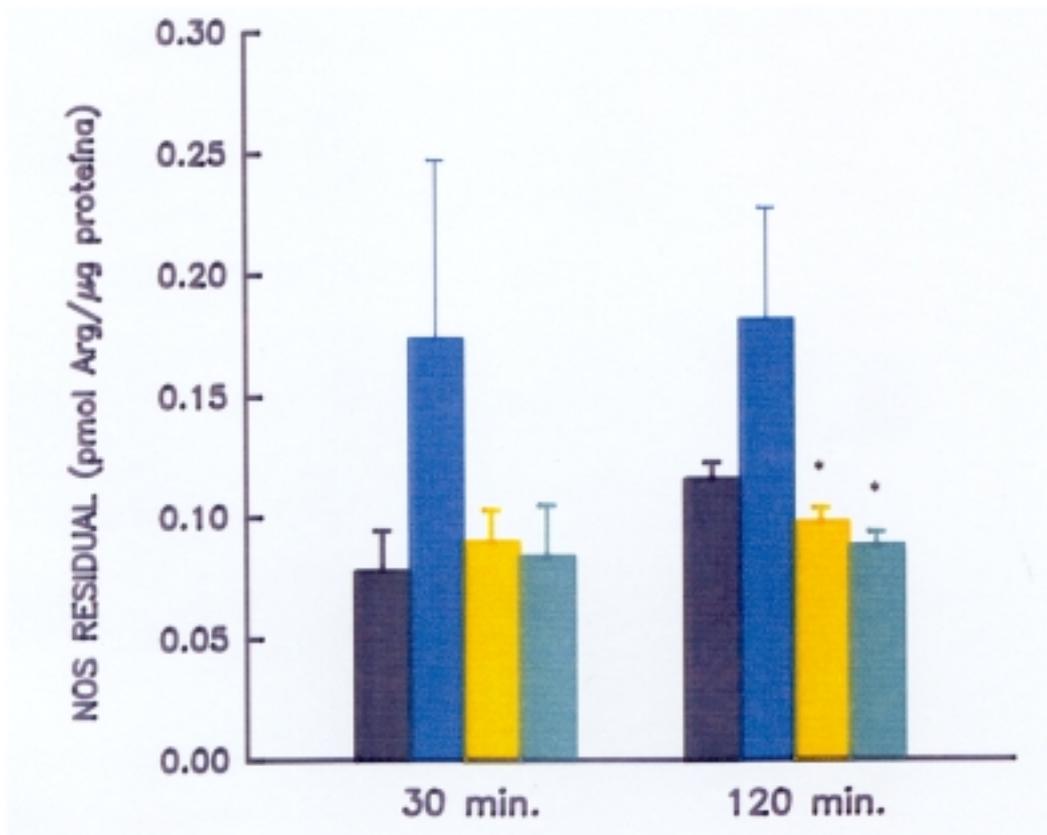


Fig 20. Actividad nitrato sintasa residual (NOS residual) en mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

MONOXIDO DE CARBONO

De forma semejante a lo observado en el caso del NO, tampoco hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de CO en el plasma en ninguna de las situaciones experimentales estudiadas. (Fig. 21; Tabla XXIV)

CO (PLASMA) (pmol/ml plasma)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	1.5333 ± 0.23333	1.5466 ± 0.23247
LPS	1.6000 ± 0.33307	1.4400 ± 0.36950
LPS + PTXF	1.7600 ± 0.32000	1.3866 ± 0.37333
LPS + SS	1.6533 ± 0.56443	2.5066 ± 0.37333

Tabla XXIV. Concentración plasmática de monóxido de carbono (CO). Efecto de LPS y del tratamiento, precoz y tardío, con PTXF y SS.

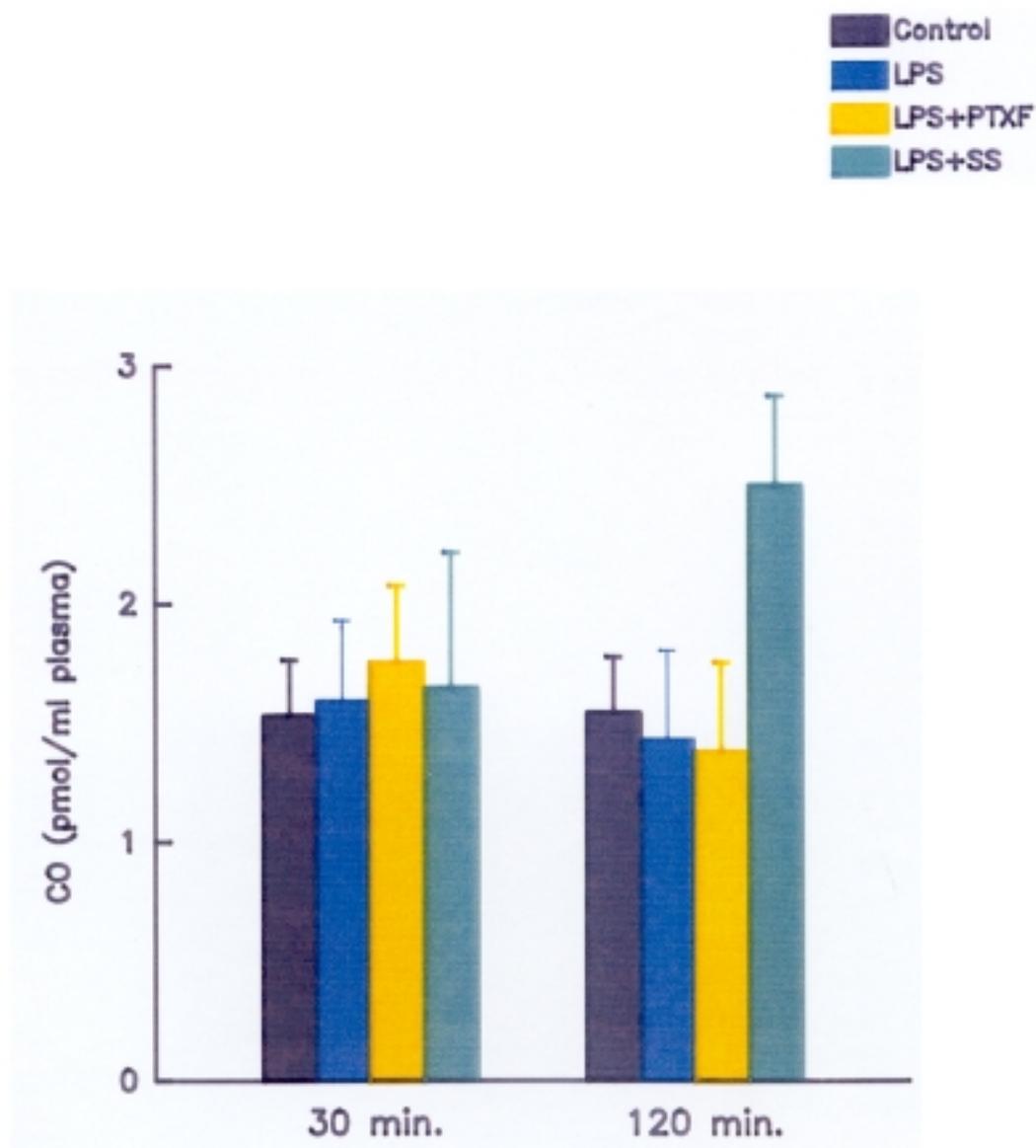


Fig 21. Concentración de monóxido de carbono (CO) en plasma. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

Sin embargo, el LPS indujo un incremento significativo en los niveles de CO en el líquido del lavado gástrico, respecto al grupo control, tras 150 (37.520 ± 3.370 vs 10.592 ± 4.329 pmol/ml lavado, $p < 0.01$; $n=5$) o 240 minutos (32.448 ± 7.885 vs 12.048 ± 3.146 pmol/ml lavado, $p < 0.01$; $n=5$) de su administración. El tratamiento con PTXF o SS 30 minutos después del LPS indujo una disminución de la concentración del CO en el lavado gástrico (20.096 ± 1.042 vs 37.520 ± 3.370 pmol/ml lavado, $p < 0.01$; $n=5$. 21.120 ± 1.993 vs 37.520 ± 3.370 pmol/ml lavado, $p < 0.01$; $n=5$, con PTXF y SS respectivamente) bloqueando el efecto del LPS, aunque en el caso de SS fue sólo parcial, encontrando diferencias significativas respecto al grupo control (21.120 ± 1.993 vs 10.592 ± 4.329 pmol/ml lavado, $p < 0.05$) (Fig. 22; Tabla XXV). Cuando la PTXF y SS se administraron dos horas después del LPS disminuyó significativamente la concentración de CO en el lavado gástrico (16.800 ± 1.170 vs 32.448 ± 7.885 pmol/ml lavado, $p < 0.05$; $n=5$. 16.720 ± 0.325 vs 32.448 ± 7.885 pmol/ml lavado, $p < 0.05$; $n=5$, tratamiento tardío con PTXF y SS respectivamente). (Fig. 22; Tabla XXV).

CO (LAVADO) (pmol/ml lavado)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	10.5920 ± 4.3290	12.0480 ± 3.14682
LPS	37.5200 ± 3.3706 *	32.4480 ± 7.88589 ***
LPS + PTXF	20.0960 ± 1.0425	16.8000 ± 1.17085
LPS + SS	21.1200 ± 1.9931 **	16.7200 ± 0.32594

Tabla XXV. Concentración de CO en el líquido del lavado gástrico tras la inyección intraperitoneal de LPS y con el tratamiento, precoz y tardío, con PTXF y SS.

* p < 0.01 vs. resto

** p < 0.05 vs. control

*** p < 0.01 vs. control

p < 0.05 vs. LPS + SS y LPS + PTXF

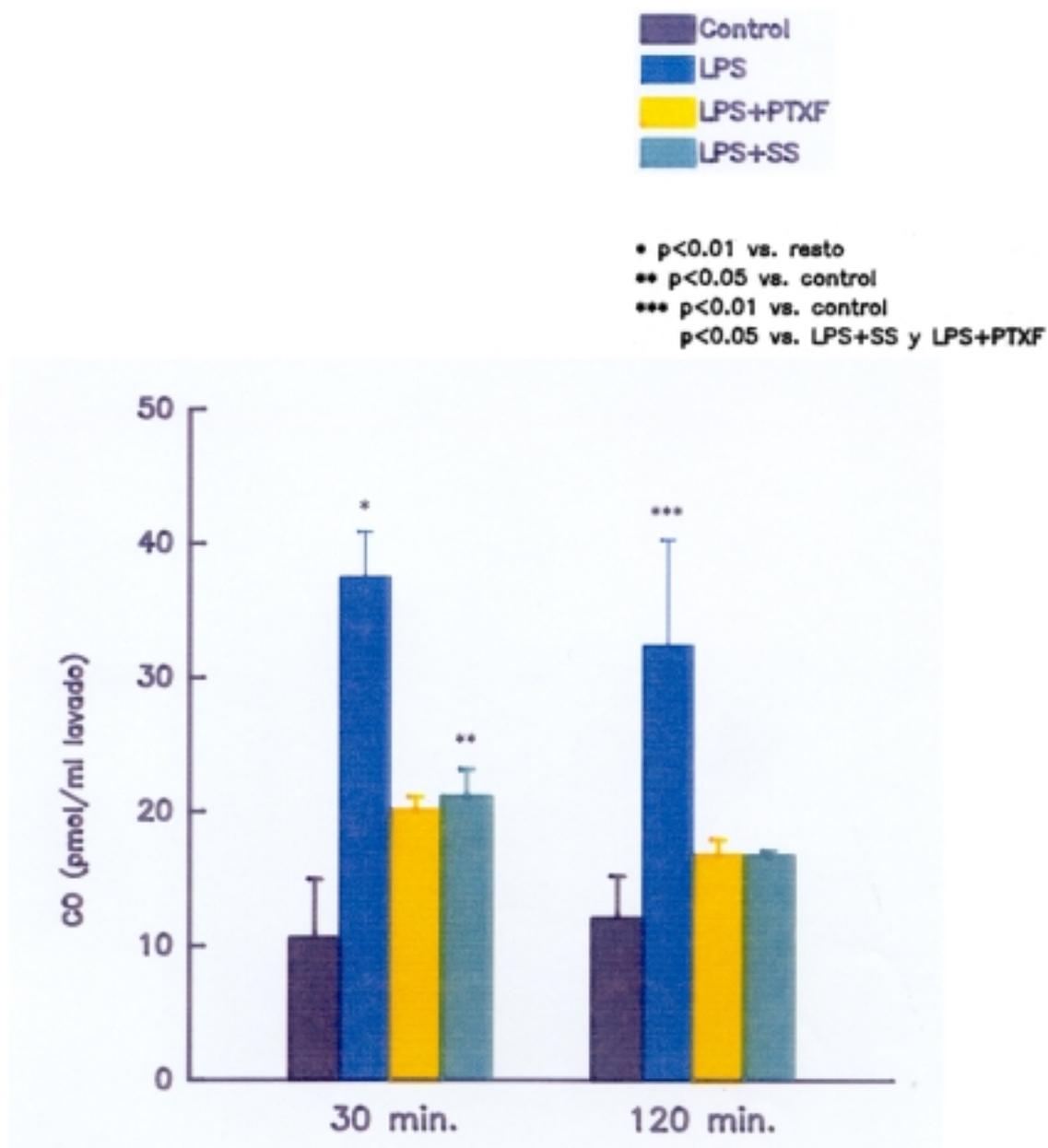


Fig 22. Concentración de monóxido de carbono (CO) en el líquido del lavado gástrico. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

SOMATOSTATINA

El LPS disminuyó significativamente los niveles de somatostatina en la mucosa gástrica. (Fig. 23; Tabla XXVI). El tratamiento con PTXF, a los 30 ó 120 minutos de la administración de LPS, no modificó, de manera significativa, el efecto producido por el LPS y, aunque se detectaron niveles ligeramente superiores a los obtenidos tras LPS, hubo diferencias estadísticas con respecto a los grupos controles (83.540 ± 11.590 vs 129.200 ± 20.276 pg/mg proteína, $p < 0.05$; $n=5$. 88.800 ± 6.204 vs 151.280 ± 24.768 pg/mg proteína, $p < 0.01$; $n=5$, tratamiento con PTXF precoz o tardío respectivamente) (Fig. 23; Tabla XXVI). La administración de SS, tanto 30 como 120 minutos después del LPS, tampoco revirtió el efecto producido por el LPS, existiendo diferencias significativas con respecto a los controles (52.260 ± 5.076 vs 129.200 ± 20.276 pg/mg proteína, $p < 0.01$; 60.100 ± 3.619 vs 151.280 ± 24.768 pg/mg proteína, $p < 0.01$, tratamiento con SS precoz o tardío respectivamente) (Fig. 23; Tabla XXVI)

SOMATOSTATINA (pg/mg proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	129.200 ± 20.2763	151.280 ± 24.768
LPS	71.180 ± 1.67314 *	81.940 ± 9.4422 *
LPS + PTXF	83.540 ± 11.5906 **	88.800 ± 6.2047 *
LPS + SS	52.260 ± 5.07628 *	60.100 ± 3.6198 *

Tabla XXVI. Contenido de somatostatina (SS) en la mucosa gástrica. Efecto de LPS y del tratamiento con PTXF y SS a los 30 y 120 min. de la administración del LPS.

* p < 0.01 vs. control

** p < 0.05 vs. control

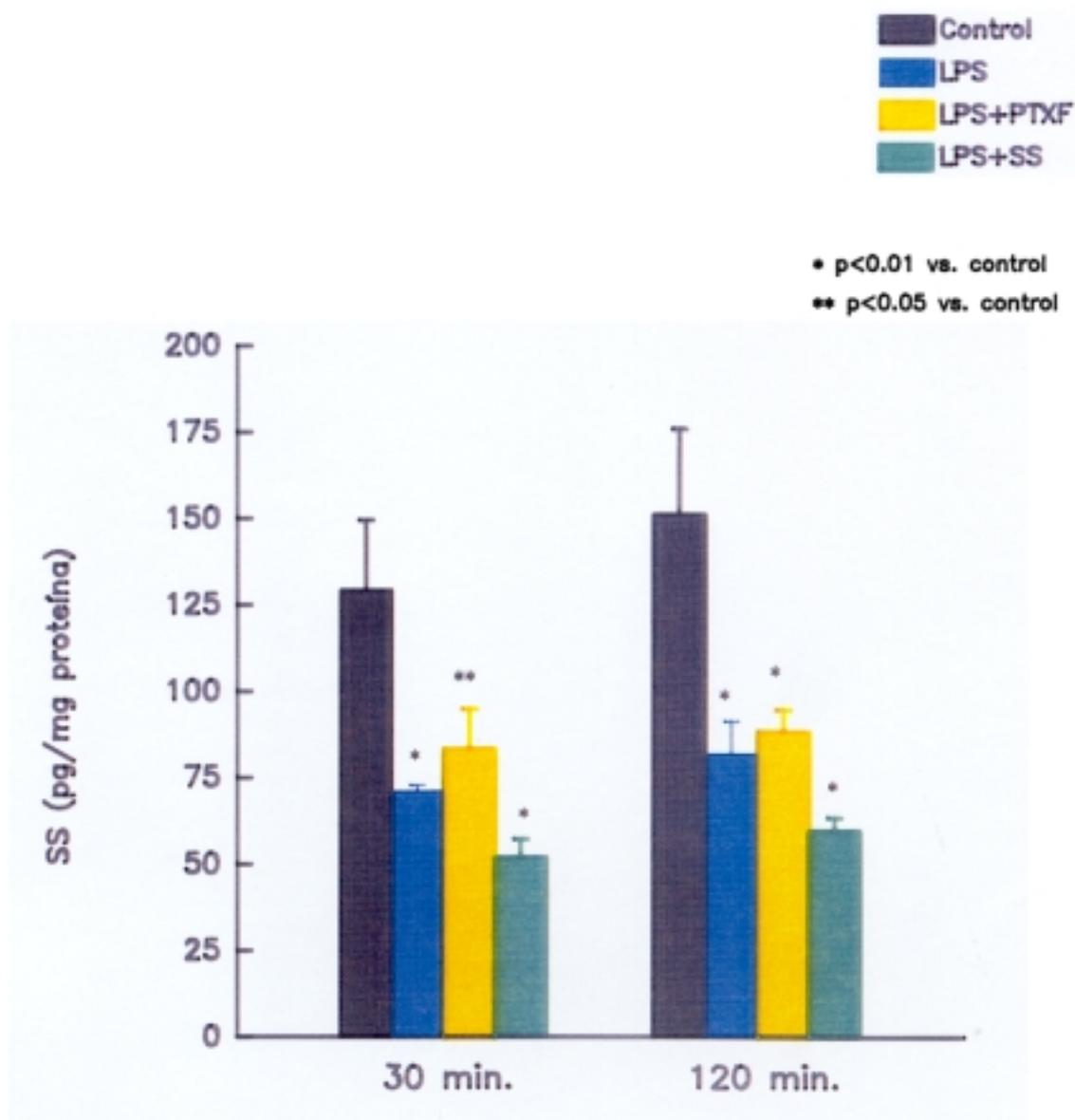


Fig 23. Contenido de somatostatina (SS) en mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 y 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

GUANOSIL MONOFOSFATO CICLICO (GMPc)

La administración de LPS aumentó significativamente la concentración de GMPc tanto a los 150 como a los 240 minutos (392.02 ± 74.81 vs 107.18 ± 40.61 fmol/mg proteína, $p < 0.01$; $n=5$. 613.76 ± 84.76 vs 92.20 ± 49.76 fmol/mg proteína, $p < 0.01$; $n=5$, a los 150 y 240 minutos respectivamente).

Tras el tratamiento con PTXF o SS ese efecto fue revertido totalmente a los 240 minutos (253.74 ± 24.66 vs 613.76 ± 84.76 fmol/mg proteína, $p < 0.01$; 119.54 ± 45.26 vs 613.76 ± 84.76 fmol/mg proteína, $p < 0.01$, tratamiento con PTXF y SS respectivamente) (Fig. 24; Tabla XXVII).

Sin embargo, en el grupo de tratamiento precoz se observó que aunque tras la inyección intraperitoneal de PTXF, la concentración de GMPc fue inferior a la del grupo LPS, no hubo diferencias significativas. Pero después de la administración de SS, 30 minutos después de la inyección de LPS, los niveles tisulares de GMPc disminuyeron significativamente (131.32 ± 49.43 vs 392.02 ± 74.81 fmol/mg proteína, $p < 0.01$); existiendo diferencias estadísticas entre el efecto provocado por SS y PTXF (131.32 ± 49.43 vs 329.92 ± 75.40 fmol/mg proteína, $p < 0.01$; tratamiento con PTXF y SS respectivamente) (Fig. 24; Tabla XXVII).

GMPc (fmol/mg proteína)

GRUPOS	30 MINUTOS	120 MINUTOS
Control	107.18 ± 40.617	92.76 ± 49.76
LPS	392.02 ± 74.815 *	613.76 ± 84.76 **
LPS + PTXF	329.92 ± 75.405 *	253.74 ± 24.66
LPS+ SS	131.32 ± 49.431	119.54 ± 45.26

Tabla XXVII. Concentración tisular de GMPc en la mucosa gástrica. Efecto del LPS y del tratamiento precoz (30 min.) y tardío (120 min.) con PTXF y SS.

* p < 0.01 vs. control y LPS + SS

** p < 0.01 vs. resto

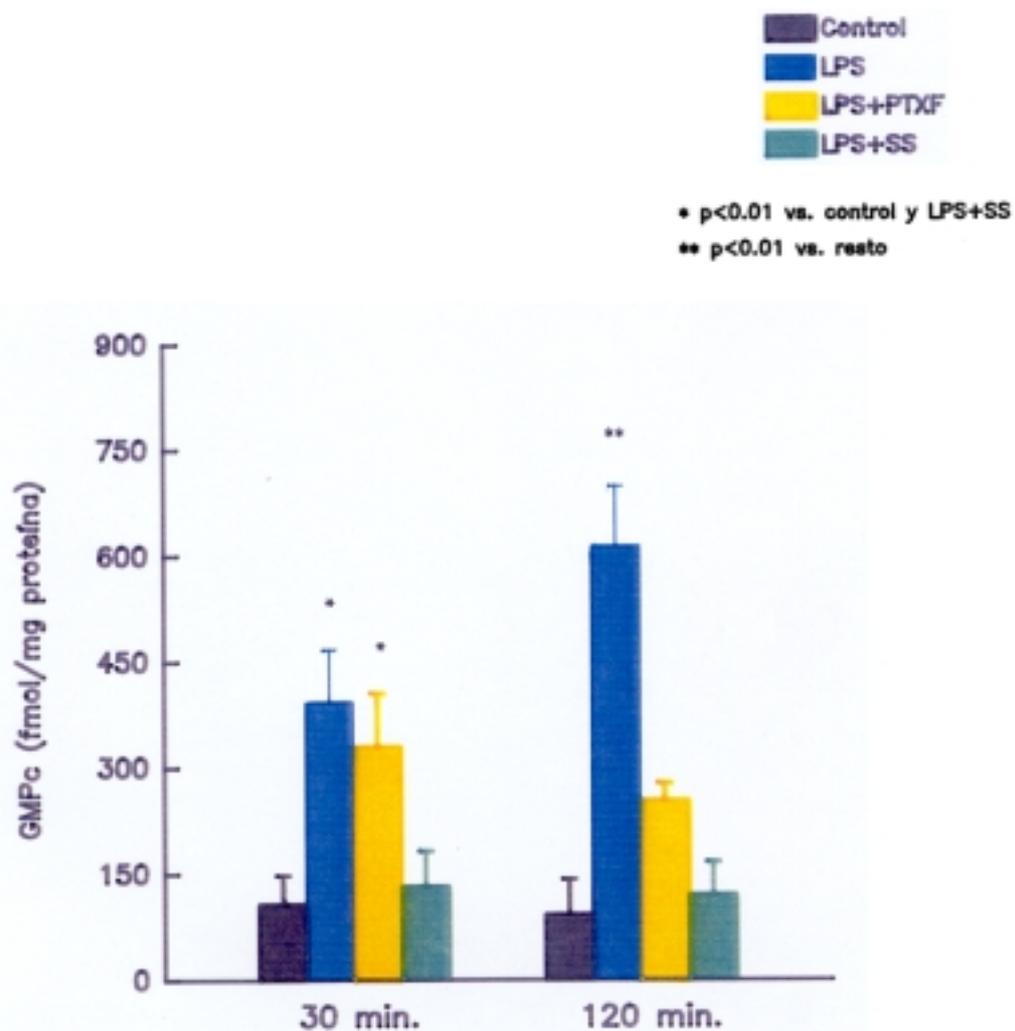


Fig 24. Contenido de GMPC en mucosa gástrica. Efecto del lipopolisacárido (LPS) y del tratamiento a los 30 o 120 minutos con pentoxifilina (PTXF) y somatostatina (SS).

DISCUSSION

La hemorragia digestiva alta procedente de gastritis erosiva continúa asociándose a una alta mortalidad cuando se desarrolla en pacientes sépticos o postoperados. Aunque la hemorragia por ulcus de estrés ha disminuido en los últimos años, todavía tiene una incidencia significativa en pacientes sépticos, siendo considerada como una manifestación del "fracaso intestinal" dentro del síndrome de fallo multiorgánico (4).

La integridad de la barrera mucosa gástrica parece jugar un papel esencial en la protección frente a esta afección. Como se dijo anteriormente, dicha barrera está formada por un gel de mucina asociado con otras proteínas y lípidos, hacia el que se vierte una secreción rica en bicarbonato, formando un gradiente de pH que protege frente a la elevada concentración intraluminal de protones.

La fosfatidilcolina (PC) es el principal componente fosfolipídico del moco gástrico y ejerce un papel en el mantenimiento de la hidrofobicidad de la barrera mucosa gástrica, protegiéndola frente a agentes potencialmente dañinos para ella. Así, Orchard y Bickerstaff (259) observaron una disminución en la concentración de PC del moco gástrico en pacientes con gastritis o úlceras gástricas frente a otro grupo control.

Por otra parte, se ha demostrado que durante la sepsis por E.Coli se produce un descenso en la síntesis de PC del surfactante pulmonar (260), por mecanismos no del todo

determinados, aunque parece que se trata de un efecto inhibitor dosis-dependiente del $\text{TNF}\alpha$, sugiriendo que esta citoquina pudiese participar en la fisiopatología del distrés respiratorio también por este mecanismo (261).

Nuestros resultados muestran una disminución en la concentración de PC del moco gástrico en los animales sometidos a la acción del LPS respecto a los controles, y por analogía con lo que sucede con la PC del surfactante pulmonar, se podría hipotetizar que uno de los mediadores implicados en dicho efecto podría ser el $\text{TNF}\alpha$ u otras citoquinas, bien modulando la actividad de enzimas reguladoras -colina quinasa (262) y glicerol-3-fosfato acil-transferasa (263,264)- de la síntesis de PC o bien mediante la producción de segundos mensajeros específicos que modificasen la actividad de dichas enzimas.

De igual manera, dado que la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) es una forma de la PC que prácticamente sólo se encuentra en el pulmón (265) y en el estómago (174), y dado y que representa aproximadamente un 30% de la PC gástrica (174), era esperable que se hallase disminuída en las ratas expuestas a la acción del LPS.

Por otra parte, existe una evidencia cada vez mayor de la importancia de las fosfolipasas como mediadoras de los fenómenos inflamatorios que acontecen durante la sepsis. Se ha demostrado una fuerte correlación entre sepsis inducida por bacterias Gram negativas y un aumento de la actividad de fosfolipasa A_2 (PLA₂) en el suero, asignándole un papel como mediador en los efectos sistémicos producidos durante el shock séptico (196).

La PLA2 es una enzima contenida en diversas células como neutrófilos, monocitos, plaquetas e incluso en células de la mucosa intestinal (194), y la endotoxina bacteriana, quizás mediante una acción modulada por citoquinas, tales como el TNF α (266), la activa, produciendo la hidrólisis de fosfolípidos. Dicha hidrólisis es un paso limitante en la liberación del ácido araquidónico, con la subsiguiente generación de productos biológicamente activos como leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos.

En modelos experimentales de distrés respiratorio (266), así como en humanos (195,267), se observó que la PLA2 degradaba activamente el surfactante, con la correspondiente acumulación de su producto de degradación, la lisofosfatidilcolina. Esto mismo podría suceder en la mucosa gástrica con lo cual PLA2 aceleraría la degradación de PC, reduciendo de este modo su concentración a nivel de la barrera mucosa gástrica, y esto podría ocurrir tanto en condiciones fisiológicas (197) como en situaciones de sepsis (195).

Además de los metabolitos del ácido araquidónico, la PLA2 puede contribuir a la generación de otros lípidos potencialmente tóxicos, tales como los lisofosfolípidos. Así Otamiri y cols. (268) han encontrado que la isquemia-reperfusión intestinal causa un incremento en el cociente lisofosfatidilcolina/fosfatidilcolina por estímulo de la PLA2 (269), y que la lisofosfatidilcolina es capaz de incrementar la permeabilidad de la barrera mucosa intestinal (268). Además, se observó que los inhibidores de PLA2 protegieron la mucosa en un modelo experimental de isquemia intestinal en ratas

(185). Otamiri y cols. (185) encontraron, en este modelo, un aumento de productos de peroxidación lipídica, tales como el malondialdehído, y un aumento en la actividad de mieloperoxidasa tisular, demostrando con ello que al menos una parte del efecto de PLA2 sobre la lesión mucosa isquémica intestinal está mediada por productos diferentes a los metabolitos del ácido araquidónico.

Nuestros resultados demuestran que existe un aumento de la actividad de PLA2 en la mucosa gástrica en las ratas sometidas a la acción del LPS, y aunque no conocemos el mecanismo último por el cual se produce, ello estaría justificando, en parte, la disminución de la concentración de PC del moco gástrico, observado en estas ratas. La inhibición por SS de la PLA2 podría explicar algunos de los efectos protectores de esta hormona dado que es conocido que todas las formas de PLA2 requieren calcio para su actividad y que la SS disminuye los niveles de calcio.

El LPS estimula la capacidad de los macrófagos para producir metabolitos del ácido araquidónico, genéricamente denominados eicosanoides, bien por la vía de la ciclooxigenasa, sintetizándose las diferentes prostaglandinas y tromboxanos, bien por la vía de la lipooxigenasa, produciéndose los leucotrienos (48). Este efecto podría estar mediado por la activación de PLA2 debida al efecto de citoquinas u otros mediadores (194). Por su parte, algunos de estos eicosanoides han demostrado "in vitro" cierta capacidad para modular la producción de citoquinas (48) y además las prostaglandinas tienen un potente efecto inhibitorio sobre otros mediadores

(PAF e histamina), producidos por los macrófagos, que tienen por sí mismos un efecto ulcerogénico sobre la mucosa gástrica (270). Los principales eicosanoides implicados en la mediación de los efectos de la endotoxina bacteriana son la PGE2, PGI2, TXA2 y LTB4.

Las prostaglandinas, especialmente la PGE2, son producidas endógenamente por la mucosa gástrica (176) y estimulan la producción de moco y bicarbonato por la misma, al tiempo que reducen la producción de ácido e incrementan el flujo sanguíneo (176,177). Se han mostrado beneficiosas en diversos modelos de lesiones gástricas agudas (271), incluyendo las secundarias a sepsis (272). Arvidsson y cols. demostraron (272), en un modelo de gastritis erosiva en gatos, que el tratamiento con misoprostol (un análogo sintético de PGE1) tenía un efecto protector que era independiente del aumento local del flujo sanguíneo y de la capacidad proliferativa de las células de la mucosa.

En el presente estudio, tras la administración de LPS, no se encontraron, sin embargo, alteraciones significativas en la concentración tisular de PGE2 respecto a los grupos control y tampoco se advirtieron cambios tras el tratamiento con SS o PTXF. Estos resultados concuerdan con los estudios de Shiratori y cols. (273) en los que demostraron que la inhibición de la secreción ácida gástrica por parte de la somatostatina es independiente de la producción de prostaglandinas endógenas (PGE2), atribuyendo su efecto a su acción inhibitoria sobre la secreción de gastrina.

Los efectos tanto del TXA2 como del LTB4 tienden a

favorecer el daño de la mucosa gástrica. En nuestros resultados se observó un aumento significativo de los niveles de TXB2 (metabolito estable de TXA2) en la mucosa gástrica tras la exposición de las ratas al LPS, y quizás su acción gastroerosiva deba buscarse a través de la acción de este metabolito sobre la microcirculación gástrica, puesto que se sabe que produce una vasoconstricción y agregación plaquetaria (33), eventos que suceden en el ulcus de estrés, y, además, induce la producción de radicales libres de oxígeno (RLO) por los neutrófilos (33), hecho que acontece en la patogénesis de estas lesiones. Se ha demostrado que sustancias atrapadoras de RLO reducen la formación de úlceras de estrés en situaciones de sepsis y shock hemorrágico (126).

El LTB4, por su parte, además de estimular la generación de RLO, produce un aumento en la quimiotaxis y adhesión de los neutrófilos y aumento de la permeabilidad vascular (274). En nuestros estudios hemos observado un aumento significativo en los niveles tisulares gástricos de LTB4, tras la administración de LPS, favoreciendo, con ello, la producción de estas ulceraciones por el mecanismo descrito, el cual podría implicar a los ácidos biliares, ya que Sullivan y cols. (181) demostraron que inhibidores selectivos de lipooxigenasa ejercen una acción citoprotectora de la mucosa gástrica frente a ácidos biliares (taurocolato). Esto proporciona un mayor apoyo a la hipótesis de una posible mediación de los leucotrienos en la acción gastroerosiva producida por los ácidos biliares.

Por otra parte, la SS se ha demostrado eficaz en la prevención de la lesión aguda de la mucosa gástrica inducida

por etanol en un modelo experimental, observando que dicho efecto estaba acompañado de una inhibición de la producción de LTB₄, y una disminución de distintos neuropéptidos, pudiendo atribuirles a ellos dicho efecto beneficioso de SS (275).

El efecto de la prostaciclina (PGI₂) es contrario al ejercido por TXA₂; es decir se opone a la agregación plaquetaria y produce vasodilatación (33) y, como se ha demostrado, la secreción de PGI₂ por el endotelio vascular está aumentada tras la exposición a LPS (33).

En este trabajo, los niveles de PGI₂ en la mucosa gástrica fueron significativamente inferiores a los controles tras la administración de LPS, lo cual favorecería el desarrollo de estas lesiones mediante un efecto directo sobre la microcirculación gástrica, produciendo vasoconstricción e isquemia en la mucosa (hechos fundamentales en el desarrollo del ulcus de estrés).

Al igual que sucede en la enfermedad arterial coronaria (276), es posible que en estas lesiones se produzca una alteración en el paso de endoperóxidos precursores desde la plaqueta a la célula endotelial (277,278), de forma que exista una disminución en tal fenómeno, lo que produciría un aumento de la concentración de TXA₂ y descenso en la concentración de PGI₂ de las células endoteliales.

La actividad mieloperoxidasa es un índice de infiltración leucocitaria (279). Como se sabe, los neutrófilos juegan un papel importante en el desarrollo de la inflamación y lesiones que acontecen durante la sepsis en distintos tejidos incluyendo la mucosa gástrica (178). En el curso de la respuesta inflamatoria

sistémica que se genera en situaciones de sepsis, los neutrófilos se agregan y se adhieren ocluyendo el flujo de sangre (ya vimos que en el estómago la microcirculación juega un papel esencial en el mantenimiento de la integridad mucosa) y liberan una serie de mediadores que amplifican los fenómenos inflamatorios locales y originan directamente un daño tisular. Estos mediadores incluyen enzimas, tales como fosfolipasa A₂, peroxidasas y proteasas, y RLO (anión superóxido o peróxido de hidrógeno), siendo probable que actúen de forma sinérgica.

Numerosos estudios experimentales (280-283) han demostrado la asociación entre la hipotensión que acontece durante el shock hemorrágico, que contribuye a la disminución del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica, y la formación de lesiones en ella. Aunque se han barajado varias hipótesis para explicar el mecanismo de la lesión gástrica inducida por isquemia, la patogénesis de ésta permanece, aún, desconocida. Recientes estudios implican al radical superóxido como responsable de la formación de estas úlceras (284) así como también de un aumento de la permeabilidad vascular (285). Además se sabe que el ion hidroxilo (OH⁻) está relacionado con un aumento de permeabilidad vascular en el intestino delgado de gatos (286). Por su parte, Itoh y Guth (126) demostraron en un modelo experimental que los RLO, especialmente O₂⁻, juega un papel importante en la formación de úlceras gástricas producidas por isquemia más instilación de ácido clorhídrico. Además, sustancias atraparoras de RLO reducen la formación de úlceras de estrés en situaciones de sepsis y shock hemorrágico, implicando a estas sustancias en la cascada de fenómenos

patogénicos que conducen a las mismas (287).

El origen principal de los RLO en el tejido isquémico intestinal es el resultado de la acción del enzima xantino oxidasa sobre la hipoxantina (286). En situaciones de isquemia, moléculas de alta energía, tales como ATP y ADP dejan de ser sintetizadas por la célula por estar reducida la fosforilación oxidativa (288,289), mientras que siguen siendo utilizadas, de esta manera disminuye la concentración de ATP y aumenta la concentración de AMP en la mucosa gástrica (290). Posteriormente, el AMP es catabolizado a sustancias intermedias como adenosina, inosina e hipoxantina. Además, en situaciones de isquemia el enzima xantino deshidrogenasa se convierte en xantino oxidasa (284,285), que es la mayor fuente de RLO. La xantino oxidasa actúa sobre la hipoxantina produciendo el anión superóxido (O_2^-) y éste, posteriormente, se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por acción de la superóxido dismutasa endógena (126).

La acción lesiva de radicales libres sobre la mucosa gástrica no parece estar en relación con la secreción gástrica de histamina (291). Aunque el mecanismo preciso de lesión tisular por radicales libres no se conoce, las siguientes hipótesis son ampliamente aceptadas. La primera es que los RLO, particularmente el OH^\cdot causan una degradación del ácido hialurónico, componente de la mucosa y así promueven la lesión de la misma (292,293). Otra hipótesis es que los RLO pueden inducir la peroxidación lipídica, que se inicia por pérdida de hidrogeniones del ácido graso que, después de una conjugación de los dobles enlaces, reacciona con la molécula de O_2 causando

de esta manera los efectos citotóxicos (294). Este hecho favorece la liberación de sustancias intracelulares como enzimas lisosomales (288,295), lo cual incrementa, posteriormente, el grado de inflamación y las lesiones tisulares (296,297). En este sentido, se ha encontrado que el alopurinol, un inhibidor de la xantina oxidasa, protege a la mucosa gástrica en modelos experimentales de shock hemorrágico, quizás debido a la inhibición de la síntesis de RLO. Por otra parte, los atrapadores ("scavengers") de RLO, superóxido dismutasa y dimetilsulfóxido, también protegen a la mucosa gástrica en este tipo de modelos experimentales y han sido incluso propuestos como potenciales agentes terapéuticos para prevenir la úlcera de estrés (287).

En el presente trabajo, hemos obtenido en el tejido gástrico un aumento de la infiltración leucocitaria como lo indica el incremento de la actividad tisular de mieloperoxidasa en las ratas a las que se les había inyectado LPS. Se podría plantear la duda de si estas células contribuyen a la lesión gástrica o si sólo son consecuencia de dicho daño. Siendo complicado distinguir entre estas dos posibilidades, se constata una fuerte correlación entre los niveles de MPO y MDA, lo que sugiere que parte de la peroxidación de lípidos en el estómago podría ser debido a leucocitos infiltrantes, a su eficiente sistema de producción de radicales libres (298), y la peroxidación lipídica podría tener lugar tanto en los propios leucocitos como en las células adyacentes.

Por otro lado, parece que parte de las acciones proinflamatorias de los leucocitos son debidas a la activación

de la PLA2 (299), que como se ha visto anteriormente es un enzima clave en la generación de agentes promotores de la inflamación como los metabolitos del ácido araquidónico y de lípidos potencialmente tóxicos como los lisofosfolípidos.

En este trabajo encontramos que la concentración tisular de malondialdehído, tras la administración de LPS, está aumentada respecto a los grupos control, y que ese efecto es bloqueado tanto por SS como por PTXF. Li y cols. (300) encontraron que SS tenía un efecto protector sobre la mucosa gástrica, en un modelo de estrés experimental, y que ello estaba asociado con una inhibición del aumento de la concentración de malondialdehído inducido por el estrés.

Por otra parte, tras administración de LPS obtuvimos una elevación de los niveles de óxido nítrico (NO) plasmáticos en el grupo LPS a los 120 minutos, en consonancia con lo publicado por Evans y cols. (57). Este efecto fue revertido por el tratamiento con PTXF o SS. Es posible que la capacidad de estas dos sustancias para prevenir la lesión aguda de la mucosa gástrica pueda estar mediada, al menos en parte, por modificaciones en la producción de NO, aunque el mecanismo por el que esto podría suceder no está claro.

Sabemos que la síntesis de NO puede ocurrir de forma fisiológica en el endotelio, SNC, SNP y en las plaquetas (131) y que depende de una isoforma de nitrato sintasa denominada constitutiva, que es calcio y calmodulina dependiente (128). Por otra parte, existe otra isoforma de ese enzima llamada inducible, que se activa en células del sistema retículo endotelial en presencia de endotoxina y de algunas citoquinas

(TNF, IL-1 e IFN- γ) (133), que es calcio y calmodulina independiente y capaz de liberar grandes cantidades de NO durante periodos prolongados.

En situaciones de sepsis, el aumento masivo de esta producción de NO ha demostrado, en parte, ser la responsable de la vasodilatación e hipotensión que acontecen en estados de shock séptico (301). Sobre la mucosa gástrica, una producción fisiológica de NO puede jugar un papel regulador del flujo sanguíneo mucoso contribuyendo, con el tono vasodilatador, al mantenimiento e integridad de la mucosa (139). Se ha demostrado que los inhibidores de la nitrato sintasa disminuyen los incrementos del flujo sanguíneo mucoso inducido por pentagastrina (188,302), lo que significa que el NO endógeno puede jugar un papel en el incremento del flujo sanguíneo por sustancias estimulantes de la secreción ácida. Asimismo, se ha demostrado en modelos experimentales que la instilación local o regional de NO reduce la lesión mucosa inducida por etanol (303).

Otros autores conceden un valor importante al NO endógeno en el mantenimiento de la integridad mucosa gástrica por actuar junto con la prostaciclina y neuropéptidos vasodilatadores, ya que por un lado la inhibición de la síntesis de NO después de la deplección de neuropéptidos vasodilatadores por pretratamiento con capsaicina o después de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas con indometacina, induce la lesión mucosa gástrica (304).

El mecanismo protector, principal, de NO sobre la mucosa gástrica es desconocido. Parece estar en relación con una

vasodilatación o inhibición de la agregación plaquetaria en la microcirculación gástrica, pero es probable que NO tenga otras acciones sobre la mucosa que aumenten o preserven la función celular epitelial y su continuidad. La fuente de NO endógeno para la gastroprotección es desconocido, y aunque es probable que el endotelio vascular sea una de ellas, otros muchos tipos de células, según recientes hallazgos, deberían de ser consideradas (139).

Una producción masiva de NO durante la sepsis podría, sin embargo, resultar dañina para la integridad de la mucosa gástrica, si bien el mecanismo por el que esto podría suceder no está claro. Aunque es probable que el NO ejerza un daño directo sobre la mucosa por aumento de la permeabilidad, también podría tener un efecto indirecto combinado con los RLO, dada la asociación conocida de NO con el anión superóxido para formar peroxinitrito (190), el cual se descompone en radical libre oxidrilo y radical libre de NO^2 , sustancias mucho más tóxicas que NO. Además de su gran poder oxidante, el peroxinitrito puede causar lesión tisular inactivando el inhibidor de α -1 proteinasa (305) y, por otro lado, se sabe que peroxinitrito es capaz de inhibir la cadena respiratoria de distintas células (306).

Por otra parte, la inyección intraperitoneal de LPS indujo un aumento significativo en la actividad tisular de nitrato sintasa total respecto a los grupos control, efecto que fue bloqueado por SS y PTXF. Ese incremento, como se deduce de nuestros resultados, fue a expensas del aumento de la actividad de la isoforma inducible, puesto que la administración de LPS

no indujo variación alguna sobre la actividad de la nitrato sintasa constitutiva, ni tampoco tras el tratamiento con PTXF o SS, corroborando la teoría que durante la sepsis el enzima responsable de la formación de NO es nitrato sintasa inducible (57,307-309). El hecho que SS y PTXF inhiban la actividad de la isoforma inducible, y por tanto, inhiban la producción de NO podría ser de importancia clínica.

Los resultados obtenidos en este trabajo son difíciles de conciliar con los de Takeuchi y cols (310), quienes encontraron en un modelo experimental en ratas que el taurocolato provocaba una lesión de la mucosa gástrica por aumento de la secreción ácida gástrica, mediada por un aumento en la concentración de NO, formado a expensas de la isoforma constitutiva de la nitrato sintasa. La explicación a esta aparente contradicción entre ambos resultados radica en que el modelo de Takeuchi y cols. está hecho "ex vivo", sobre estómagos perfundidos con suero salino y eso, probablemente, evita la acumulación de macrófagos y, por tanto, la posibilidad que éstos se activen y produzcan citoquinas, las cuales posteriormente activarán la isoforma inducible de la nitrato sintasa en los propios macrófagos o en otras células diana. Además, no se ha demostrado que el taurocolato, por sí mismo, active la nitrato sintasa inducible.

Por otro lado, cabe pensar que si un gas nocivo como el NO tiene propiedades como mensajero intracelular y ejerce funciones tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, quizás otros gases pudieran tener unas funciones similares. En este sentido, se ha descrito que el monóxido de carbono (CO)

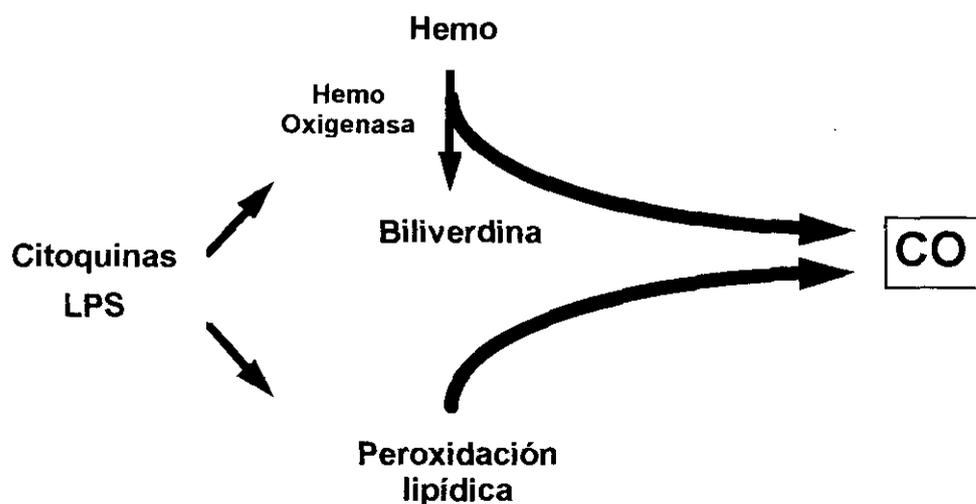
comparte diversas propiedades del NO y se ha sugerido que podría también ejercer efectos fisiológicos. De igual forma que el NO, el CO puede unirse al átomo de hierro de las hemoproteínas (311-313), incluyendo el grupo hemo de la guanilato ciclasa (313). Además, ambos pueden interaccionar con los centros Fe-S de una amplia variedad de enzimas, inhibiéndolas.

Se han demostrado papeles fisiológicos análogos a los descritos para el NO. Por ejemplo, el CO inhibe la agregación plaquetaria y, aunque de forma menos potente que el NO, induce la relajación del endotelio (314). Estos efectos, aparentemente, están mediados por la activación del enzima guanilato ciclasa (191,313). Se ha propuesto que el CO puede activar la guanilato ciclasa en las células en las que es producido, o bien en células adyacentes. En macrófagos, la elevación de los niveles de GMPC, secundarios a la activación de dicho enzima, facilita los efectos antimicrobianos y/o tumorocidas.

Si el CO ejerce unos efectos fisiológicos, es porque debe de tener un origen endógeno. Se conocen al menos dos fuentes endógenas de CO. Una es el metabolismo del grupo hemo, catalizado por el enzima hemo oxigenasa (315), que da lugar a biliverdina y CO. Las células del sistema retículo endotelial del bazo y riñón son ricas en este enzima, lo cual está en consonancia con el papel del sistema retículo endotelial en el catabolismo de la hemoglobina. Además, se ha descrito la actividad de este enzima en células del cerebro, pulmón y en macrófagos peritoneales y alveolares. Multitud de sustancias,

tanto exógenas como endógenas, de diversa estructura y función, así como factores tan dispares como los rayos X, el estrés, la fiebre, la desnutrición o el magullamiento de la piel, se han mostrado capaces de inducir la actividad de la hemooxigenasa (HO) (316). Además, se ha sugerido que dicha inducción es un mecanismo general de respuesta celular frente a la lesión por radicales libres de oxígeno (son bien conocidas las propiedades antioxidantes de los metabolitos del grupo hemo) (317). La transcripción del RNAm de HO es inducida por diversos agentes prooxidantes, particularmente aquellos que conllevan deplección del glutatión (318). Por otro lado, el LPS y algunas citoquinas se han mostrado capaces de inducir la actividad de HO en el hígado de ratón (319) y en macrófagos eritrofagocíticos "in vitro" (320).

Otra fuente endógena de CO es el resultado de la peroxidación de lípidos de la membrana (192). Esto puede estar en relación con la posibilidad de que el CO pueda mediar algunas de las acciones de las citoquinas, puesto que, como se ha demostrado, la formación de los radicales libres median algunos de los efectos de las mismas (321), y es generalmente aceptada que los efectos tóxicos de los radicales libres incluyen la lesión de las membranas, secundariamente a reacciones peroxidativas de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las mismas (322).



Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran que la inyección intraperitoneal de LPS indujo un aumento significativo de los niveles de CO en el lavado gástrico respecto a los grupos control, efecto revertido, parcialmente, tanto por SS como por PTXF. Quizás pudiéramos explicar estos resultados considerando la infiltración mucosa por polimorfonucleares neutrófilos, tras la administración de LPS, con la consiguiente generación de radicales libres de oxígeno y peroxidación de lípidos de membrana. Esto explicaría también el mecanismo protector de SS y PTXF dado que ambas sustancias son capaces de disminuir el índice de infiltración leucocitaria que conlleva una disminución de la generación de RLO.

Tanto el NO como el CO son gases muy difusibles y cabría pensar que el aumento de su concentración en el lavado gástrico

podría ser secundario a unos niveles plasmáticos incrementados que han favorecido su paso a la luz gástrica. Sin embargo, pensamos que en nuestro modelo se trata de una producción local ya que hemos encontrado diferencias en los niveles plasmáticos.

El receptor primario para el NO y el CO en las células efectoras parece ser la guanilato ciclasa soluble (323,324). La unión de ambas moléculas al átomo de hierro del hemo asociado a la guanilato ciclasa soluble induce transformaciones alostéricas en el enzima, activándolo, que origina un aumento de los niveles de GMPC. Este último es un nucleótido importante como segundo mensajero celular que regula varias proteínas quinasas, fosfodiesterasas y canales iónicos, y ha sido implicado como mediador en distintas respuestas biológicas, como en las modificaciones del estado redox (313) y en los movimientos de calcio. El aumento de la concentración de GMPC induce un aumento de entrada de calcio a las células (325). Por otro lado, el estrés oxidativo, puede producir cambios en las señales de calcio (326-328) y se ha visto que ello contribuye a los cambios patológicos observados en los primeros estadios de la toxicidad del oxígeno (329). Por otro lado, se ha implicado al adenosil-monofosfato cíclico (AMPC) y GMPC como reguladoras de la producción de TNF α (330,331).

Nosotros obtuvimos un aumento significativo en la concentración tisular de GMPC, con respecto a los grupos control, tras el tratamiento con LPS, lo cual podría explicarse, por una parte, por el aumento de la actividad de la nitrato sintasa inducible y la sobreproducción de NO, y por otra, por un aumento de la actividad hemooxigenasa y de la

peroxidación lipídica y un consiguiente aumento de CO. Estos efectos fueron revertidos por SS y PTXF. Según estos resultados una hipótesis sería que la SS ejerciera sus acciones disminuyendo el contenido intracelular de GMPc. Por otro lado sabemos que PTXF, un agente inhibidor de la fosfodiesterasa, produce un aumento de la concentración de AMPc sin modificar la de GMPc. Así podríamos deducir que el balance entre ambos nucleótidos, más que el aumento o disminución de cada uno de ellos por separado, serían importantes en la mediación de la lesión tisular. Este hecho lo apoyan distintos autores (332) al observar, en modelos de úlcera gástrica experimental en ratas, que la relación entre AMPc/GMPc se encuentra disminuída, atribuyendo el efecto protector de prostaciclina y antagonistas de receptores H₂ al aumento en dicha relación.

La somatostatina (SS) es un tetradecapéptido cíclico distribuído ampliamente por el tracto gastrointestinal, aunque está confinado principalmente a las células D de la mucosa gástrica y al páncreas (333). En el estómago, la SS inhibe la secreción ácida por acción directa sobre las células parietales (334) e indirecta, al inhibir la de gastrina, mediante un mecanismo de bloqueo de la movilización de histamina (335), sustancia clave en la regulación de la secreción ácida, y quizás la SS ejerza esta acción paracrina mediante mecanismos que impliquen al AMPc (336,337). Schubert y cols (338) proponen un mecanismo a través del cual SS inhibe la secreción ácida gástrica utilizando como segundo mensajero al AMPc. La SS se acopla a la subunidad inhibitoria (Gi) de un sistema de proteínas asociadas al guanidil-trifosfato (GTP), dicho sistema

inhibe la adenilciclase, disminuyendo los niveles de AMPc. Este AMPc se une a una proteína-kinasa capaz de fosforilar una proteína necesaria para activar la bomba de protones o H⁺-K⁺-ATPasa, última responsable de la secreción de hidrogeniones a la luz glandular.

La secreción de moco por la mucosa gástrica aumenta significativamente de modo dosis dependiente con la administración de SS, pudiendo de esta forma contribuir a su acción protectora de la mucosa gástrica (243). Otros efectos de SS en el estómago incluyen la inhibición de la secreción de pepsinógeno y del vaciamiento gástrico (243,333).

La SS se ha mostrado capaz de ejercer un papel citoprotector en úlceras gastroduodenales, en animales y en humanos (339). Estos efectos podrían deberse a la mediación de sus grupos sulfidrilos (-SH) (340), o bien a la secreción endógena de prostaglandinas inducida por la propia SS (341). Romano y cols. (341) atribuyen el papel citoprotector de SS a la inhibición de la secreción ácida y a la acción de SS sobre la vasculatura gástrica, a través de la inducción de la síntesis de prostaglandinas por parte de las células endoteliales y macrófagos, que mantendrían el flujo sanguíneo impidiendo su interrupción por agentes lesivos. Omura subraya, incluso, la importancia de la prostaglandina E₂ como mediadora del efecto producido por SS sobre la mucosa gástrica (342).

Wallace y cols. demostraron que la eficacia de SS para proteger la mucosa gástrica de la lesión en diversos modelos experimentales, incluido el endotóxico, no sólo radica en la inhibición de la secreción ácida (343). La SS puede ejercer la

acción protectora mediante mecanismos aún no del todo determinados, pero que implican a neuropéptidos, sustancia P y VIP, así como a la inhibición de la producción mucosa de leucotrienos, como demostraron Karmeli y cols (275) en un modelo experimental de lesión mucosa inducida por etanol en ratas.

En nuestro estudio, la administración de LPS indujo una disminución de los niveles tisulares gástricos de SS, respecto a los grupos control, efecto bloqueado tanto por SS como por PTXF.

Para comprender el posible efecto protector de pentoxifilina (PTXF) sobre la mucosa gástrica en nuestro modelo experimental, debemos realizar las siguientes consideraciones:

Cada vez es mayor la evidencia de que la PTXF ejerce un importante efecto sobre los mediadores celulares de la inflamación y lesión tisular (344-346). La acción moduladora que PTXF ejerce sobre la producción de $TNF\alpha$ (331) parece estar en relación con una posible inhibición de la transcripción del RNAm TNF (347).

La PTXF se ha mostrado beneficiosa en modelos experimentales de shock séptico y síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA) (227,347) al disminuir la producción de $TNF\alpha$ por macrófagos activados (331,348) y también por bloqueo de algunos de los efectos de $TNF\alpha$ sobre el endotelio vascular (349).

Por otra parte, en recientes trabajos, se ha demostrado que la PTXF podría tener un efecto protector directo frente a las acciones de citoquinas (350), habiendo sido avanzadas

diversas hipótesis para explicar este mecanismo: una de ellas se basa en el hecho que la PTXF aumenta la concentración de AMPc intracelular por inhibición de la fosfodiesterasa (351) y eso parece jugar un papel importante en la disminución de la lesión de diversos órganos diana (226,352). En la úlcera gástrica experimental se ha observado un descenso importante en la relación AMPc/GMPc que, si bien ocurre fundamentalmente a expensas de un aumento de GMPc, también existe un descenso en la concentración de AMPc (332). Otra hipótesis se apoya en que la PTXF induce la secreción en el endotelio vascular de PGI2 (353), un mediador capaz de proteger células adyacentes frente a algunos agentes nocivos (354). Este metabolito se ha mostrado, por otro lado, como un agente citoprotector de la mucosa gástrica. Aunque el mecanismo exacto de este efecto protector no está determinado, se postula que el efecto vasodilatador sobre la microcirculación gástrica puede estar mediado, a su vez, por un aumento en la relación AMPc/GMPc (332). Finalmente, se ha demostrado que PTXF es un potente inhibidor de la formación de radicales libres (231,345), implicados en la mediación de algunos de los efectos de las citoquinas (355,356). Aunque algunos autores han señalado que este mecanismo no parece existir "in vivo" (357), Santucci y cols (230) demostraron que PTXF evita la lesión aguda de la mucosa gástrica por disminución de la adhesión de neutrófilos, fuente de RLO, al endotelio vascular mediante la reducción de los niveles de TNF α , sin ejercer efecto sobre la concentración de prostaglandinas de la mucosa.

Otra de las acciones atribuidas a PTXF, y que contribuiría

al efecto protector de la mucosa gástrica, es el efecto inhibitorio observado sobre la fosfolipasa A₂ de plaquetas estimuladas por trombina (358). Ya vimos anteriormente la importancia de PLA2 como pivote regulador en la formación de distintos productos intermediarios, con funciones claves en el proceso de inflamación que acontece en estados de sepsis, así como en la cascada de acontecimientos que suceden en el ulcus de estrés.

En resumen, a la vista de nuestros resultados, se deduce que SS y PTXF tienen un gran efecto protector en el desarrollo de la lesión aguda de la mucosa gástrica inducida por sepsis, y que ambas podrían tener un papel importante como reguladoras en el proceso inflamatorio. Los mecanismos mediante los cuales SS y PTXF ejercen sus efectos parecen ser muy diversos, siendo necesarios posteriores estudios encaminados a una mayor comprensión de los mismos.

CONCLUSIONES

1. El LPS indujo una marcada inhibición de la síntesis de PC, así como de la forma disaturada, dipalmitoilfosfatidilcolina en la mucosa gástrica.
2. Los cambios en la síntesis de PC fueron acompañados por incremento en la actividad mieloperoxidasa y en la concentración de malondialdehído, tromboxano B₂ y leucotrieno B₄ de la mucosa gástrica. Por el contrario, el LPS disminuyó el contenido de PGI₂ en mucosa.
3. El LPS también aumentó los niveles de NO y CO en lavado gástrico sin afectar paralelamente los niveles plasmáticos. Este efecto fue acompañado por un aumento de la actividad nitrato sintasa inducible y de la concentración de GMPc en mucosa.
4. La pentoxifilina y somatostatina evitan los efectos descritos inducidos por la administración del Lipopolisacárido bacteriano.
5. Nuestros resultados sugieren que la sepsis por bacterias Gram negativas puede alterar la barrera mucosa gástrica reduciendo su contenido hidrofóbico de fosfolípidos. También sugieren que tanto la pentoxifilina como la somatostatina podrían tener un efecto beneficioso en las lesiones gástricas secundarias a sepsis restaurando la producción de fosfatidilcolina, e inhibiendo la producción de otros posibles mediadores lesivos.
6. Las alteraciones producidas por la sepsis en la barrera mucosa gástrica podrían estar mediadas, al menos en parte, por modificaciones en la producción de NO y CO, con la consecuente activación de la guanilato ciclasa y aumento del contenido de GMPc.

BIBLIOGRAFIA

1. Parrillo JE: Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993; 328:1471-7
2. Bell RC, Coalson JJ, Smith JD, Johansson WG: Multiple organ system failure and infection in adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 1983; 99:293-8
3. Skillmann JJ, Bushnell LS, Goldman H, Silen W: Respiratory failure, hypotension, sepsis and jaundice: A clinical syndrome associated with lethal hemorrhage from acute stress ulceration of the stomach. *J Surg* 1969; 117:523-9
4. Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL, Polk HC Jr: Multiple system organ failure: The role of uncontrolled infection. *Arch Surg* 1980; 115:136-40
5. Haglund U: Stress ulcers. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25 (175):27-33
6. Menguy R: The prophylaxis of stress ulceration. *N Engl J Med* 1980; 302:461-2
7. Nakagawa K, Okada A, Kawashima Y: Acute gastric mucosal lesions. A new experimental model and effect of parenteral nutrition. *JPEN* 1985; 9:571-82
8. Norton L, Greer J, Eiseman B: Gastric secretory response to head injury. *Arch Surg* 1970; 101:200-4
9. Bowen JC, Fleming WH, Thompson JC: Increased gastrin release following penetrating central nervous system injury. *Surgery* 1974; 75:720-4
10. Reusser P, Gyr K, Scheidegger D, Buchmann B, Buser M, Zimmerli W: Prospective endoscopic study of stress erosions and ulcers in critically ill neurosurgical patients: current incidence and effect of acid-reducing prophylaxis. *Crit Care Med* 1990; 18:270-4
11. Marrone GC, Silen W: Pathogenesis, diagnosis and treatment of acute gastric mucosal lesions. *Clin Gastroenterol* 1984; 13:635-50
12. Lucas CE, Sugawa C, Riddle J, Rector F, Rosenberg B, Walt AJ: Natural history and surgical dilemma of "stress" gastric bleeding. *Arch Surg* 1971; 102:266-73
13. Hastings PR, Skillman JJ, Bushnell LS, Silen W: Antiacid titration in the prevention of acute gastrointestinal bleeding. A controlled, randomized trial in 100 critically ill patients. *N Engl J Med* 1978; 98: 1041-5
14. Martin LF, Larsson GM, Fry DE: Bleeding from stress gastritis. Has prophylactic pH control made a difference?. *Am Surg* 1985; 51: 189-93

15. Fusamoto H, Hagiwara H, Meren H, Kasahara A, Hayashi N, Kawano S, Sugimoto T, Kamada T: A clinical study of acute gastrointestinal hemorrhage associated with various shock states. *Am J Gastroenterol* 1991; 86 (4):429-33
16. Niederman MS, Craven DE, Fein AM, Schultz DE: Pneumonia in the critically ill hospitalized patient. *Chest* 1990; 97:170-81
17. Ritchie WP: Acute gastric mucosal damage induced by bile salts, acid and ischemia. *Gastroenterology* 1975; 68:699- 707
18. Solem D, Strate RG, Fischer RP: Antiacid therapy and nutritional supplementation in the prevention of Curling's ulcer. *Surg Gynecol* 1979; 148:367-70
19. Choctaw WT, Fugita C, Zawacki BE: Prevention of upper gastrointestinal bleeding in burn patients: a role for "elemental" diet. *Arch Surg* 1980; 115:1073-6
20. Cook DJ, Fuller HD, Guyatt GH, Marshall JC, Leasa D, Hall R, Winton TL, Rutledge F, Tood TJR, Roy P, Lacroix J, Griffith L, Willan A: Gastrointestinal bleeding in the critically ill: Stress ulcer prophylaxis is not for everyone. *Gastroenterology* 1994; 107:1560-6
21. Schuster DP, Rowley H, Feinstein S, McGue MK, Zuckerman GR: Prospective evaluation of the risk of upper gastrointestinal bleeding after administration to a medical intensive care unit. *Am J Med* 1984; 76:623-30
22. Wilcox CM, Spenny JG: Stress ulcer prophylaxis in medical patients: who, what, and how much?. *Am J Gastroenterol* 1988; 83:1199-211
23. Brown R, Klar J, Teres D, Lemeshow S, Sands M: Prospective study of clinical bleeding in intensive care unit patients. *Crit Care Med* 1988; 16:1171-6
24. Braunwald E, Williams GH: Alterations in arterial pressure and the shock syndrome. En: Braunwald E, Kurt JJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS. Eds *Harrison's principles of Internal medicine*, 11thEd. Mc Graw-Hill Book Company, 1987:153-8
25. Bone RC: Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure a plea for comparable definitions (Editorial). *Ann Intern Med* 1991; 114:332-3
26. Parrillo JE: Septic shock in humans: advances in understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113:227-42
27. Darville T, Giroir B, Jacobs R: The systemic inflammatory response syndrome (SIRS): Immunology and potential immunotherapy. *Infection* 1993; 21:279-90
28. Centers for disease control. National nosocomial infections study. Annual summary, february 1978; 1976:1-3

29. Young LS, Martin WJ, Meyer RD, Weinstein RJ, Anderson ET: Gram-negative rod bacteriemia: microbiologic, immunologic, and therapeutic considerations. *Ann Intern Med* 1977; 86:456-71
30. DuPont HL, Spink WW: Infections due to gram-negative organisms: an analysis of 860 patients with bacteriemia at the University of Minnesota Medical Center, 1958-1966: *Medicine* 1969; 48:307-32
31. Perlino CA, Rimland D: Alcoholism, leukopenia, and pneumococcal sepsis. *Am Rev Resp Dis* 1985; 132:757-60
32. Young LS: Gram-negative sepsis. En Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE. Eds principles and practice of infectious disease. 3rd ed New York, Churchill Livingstone, 1990:611- 36
33. Billiau A, Vandekerckhove F: Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:559-73
34. Westphal O, Hann K, Himmelspach K: Chemistry and immunochemistry of bacterial lipopolysaccharide ascell wall antigens amd endotoxins. *Prog Allergy* 1983; 33:9-39
35. Manthous CA, Hall JB, FCCP, and Samsel RW: Endotoxin in human disease. Part 1: Biochemistry, assay, and possible role in diverse disease states. *Chest* 1993; 104:1572-81
36. Tobias PS, Soldan K, Ulevitch RJ: isolation of a lipopolysaccharide binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 1986; 164:777
37. Schumann RR, Leong SR, Flagss GW, Gray PW, Wright S, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ: Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249:1429-31
38. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249:1431-3
39. Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA et al: Neutrophil- mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 1986; 77:1233-43
40. Homan RG, Maier RV: Superoxide production by neutrophils in a model of adult respiratory distress syndrome. *Arch Surg* 1988; 123:1491-5
41. Weiss SJ: Tissue destructions by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320:365-76
42. Kunkel DL, Scales WE, Spengler R, Spengler M, Larrick J: Dynamics and

- regulation of macrophage tumor necrosis factor- α (TNF), Interleukin-1- α (IL-1 α), and interleukin- 1- β gene expression by arachidonate metabolites. In: Powanda MC, ed. Monokines and other non-lymphocytic cytokines. New York: Alan R Liss, 1988:61-6
43. Tabor DR, Burchett SK, Jacobs RF: Enhanced production of monokines by canine alveolar macrophages in response to endotoxin-induced shock. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988; 187:408-15
 44. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC: Passive immunization against-cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effects of endotoxin. *Science* 1985; 229:869-71
 45. Dinnarello CA, Bishai I, Rosenwasser LJ, Coceani F: The influence of lipoxygenase inhibitors of the "in vitro" production of human leukocyte pyrogen and lymphocyte activating factor (interleukin-1). *Int J Immunopharmacol* 1984; 6:43-50
 46. Haeffner-Cavaillon N, Cavaillon J-M, Laude M, Kazatchkine MD:C3a (C3a des Arg) induces production and release of interleukin 1 by cultured human monocytes. *J Immunol* 1987; 139:794-9
 47. Bone RC, Fisher CJ, Clemmer TP et al: Sepsis syndrome: a valid clinical entity. *Crit Care Med* 1989; 17:389-93
 48. Kunkel SS: The importance of arachidonate metabolism by immune and nonimmune cells. *Lab Invest* 1988; 58:119-21
 49. Camussi G, Bussolini F, salvidio G, Baglioni C: Tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet- activating factor. *J Exp Med* 1987; 166:1390-404
 50. Meyer JD, Yurt RW, Duhaney R et al: Tumor necrosis factor- enhanced leukotriene B₄ generation and chemotaxis in human neutrophils. *Arch Surg* 1988; 123:1454-8
 51. Chang HW, Feddersen CO, Henson PM, Voelkel NF: Platelet- activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest* 1987; 79:1498-509
 52. Olson NC, Dobrowdki RT, Fleischer LN: Dexamethasone blocks increased leukotriene B₄ production during endotoxin induced lung injury. *J Appl Physiol* 1988; 64:2100-7
 53. Winn R, Harlan J, Nadir B, Harker L, Hildebrandt J: Thromboxane A₂ mediates lung vasoconstriction but not permeability after endotoxin. *J Clin Invest* 1983; 72:911-8

54. Till GO, Johnson JK, Kunkel R, Ward PA: Intravascular activation of complement and acute lung injury. Dependency of neutrophils and toxic oxygen metabolites. *J Clin Invest* 1982; 69:1126-35
55. Anderson DC, Miller LJ, Schmalsteig RC, Rothlein R, Springer TA. Contributions of the Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: structure- function assessments employing subunit-specific monoclonal antibodies. *J Immunol* 1986; 137:15-27
56. Taylor FB, Chang A, Ruf W, Morrissey JH, Hinshaw LB, Catlett R et al: E coli septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ Shock* 1991; 33:127-34
57. Evans E, Carpenter A, Kinderman H, and Cohen J: Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. *Circ Shock* 1993; 41:77-81
58. Schlag G, Redl: Mediators of sepsis. In: Vincent JL, ed. *Update in Intensive Care and Emergency Medicine: Septic Shock*. Berlin: Springer-Verlag, 1987; 4:51-73
59. Ikejima TC, Dinarello CA, Gill DM, Wolff SM: Induction of human interleukin 1 by a product of *Staphylococcus aureus* associated with toxic shock syndrome. *J Clin Invest* 1984; 73:1312-20
60. Jupin C, Anderson SD, Damais C, Alouf JE, Parant M: Toxic shock syndrome toxin 1 as an inducer of human necrosis factor and γ interferon. *J Exp Med* 1988; 167:752-61
61. Micusan VV, Desrosiers M, Gosselin J, Mercier G, Oth D, Bhatti AR, Heremans H, Billiau A: T-cell stimulation and interferon induction by toxic shock syndrome toxin-1. *Rev Inf Dis* 1989; 11-S:305-15
62. Marrack P, Blackman M, Kushnir E, Kappler J: The toxicity of Staphylococcal enterotoxin B in mice is mediated by T cells. *J Exp Med* 1990; 171:455-64
63. Semeraro M: Endotoxins and haemostasis. *Acta Clin Belgica* 1976; 31:377-92
64. Müller-Berghaus G. In: Verstraete M et al., eds. *Thrombosis and Haemostasis*. University Press Leuven 1987:619-71
65. Warr TA, Mohan-Rao LV, Rapaport SI: Disseminated intravascular coagulation in rabbits induced by administration of endotoxin or tissue factor: effect of anti-tissue factor antibodies and measurement of plasma extrinsic pathway inhibitor activity. *Blood* 1990; 75:1481- 9
66. Nawroth PP, Stern DM: Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986; 163:740-5
67. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA: Interleukin 1

- induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med* 1984; 160:618-23
68. Henson PM: PAF- a perspective. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989; 1:263-5
 69. Doebber TW, Wu MS, Robbins JC, Choy BM, Chang MN, Shen TY: Platelet activating factor involvement in endotoxin- induced hypotension in rats. Studies wiyh PAF receptors antagonist kadsurenone. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 127:799-808
 70. Sakai A, Chang S, Voelkel NF: The importance of vasoconstriction in lipid mediator induced pulmonary edema. *J Appl Physiol* 1990; 68:1059-68
 71. Bone RC: The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; 115:457-69
 72. Goetzl EJ: Neuromodulation of immunity and hypersensitivity. *J Immunol* 1985; 135:Suppl:S739-S143
 73. Wilson D, de Garavilla L, Kuhn W, Togo J, Burch RM, Steranka LR: D-Arg-(Hyp³-D-Phe⁷)-bradykinin, a bradykinin antagonist, reduces mortality in a rat model of endotoxic shock. *Circ Shock* 1989; 27:93-101
 74. Hwang D: Essential fatty acids and the immune response. *FASEB J* 1989; 3:2052-61
 75. Michie HR, Manogue KR, Sprigss DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello A, Cerami A, Wolff SM, Wilmore DW: Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Medicine* 1988; 318:1481-6
 76. Tracey KJ: Tumor necrosis factor (Cachectin) in the biology of septic shock syndrome. *Cir Shock* 1991; 35:123-8
 77. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CE: Interleukin-1 induces a shock-like state en rabbits. *J Clin Invest* 1988; 81:1162-72
 78. Molloy RG, Mannick JA, Rodrick ML: Citocinas, infección e inmunomodulación. *Br J Surg (Ed Esp)* 1993; 80:289-97
 79. Rouzer CA, Cerami A: Hypertriglyceridemia associated with *Trypanosoma brucei* infection in rabbits: role of defective triglyceride removal. *Mol Biochem Parasitol* 1980; 2:31-8
 80. Guy MW: Serum and tissue fluid lipids in rabbits experimentally infected with *Tripanosoma brucei*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1975; 69:429A
 81. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:3666-70

82. Aggarwal BB, Eassalu TE, Hass PE: Characterization of the receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by γ interferon. *Nature* 1985; 318:665-7
83. Tsujimoto M, Vilceck T: Tumor necrosis factor receptors in HeLa cells and their regulation by interferon gamma. *J Biol Chem* 1986; 261:5384-8
84. Hesse DG, Davatelis G, Felsen D et al: Cachectin/tumor necrosis factor gene expression in Kupffer cells. *J Leuk Biol* 1987; 42:422-31
85. Matthews N: Tumor necrosis factor from the rabbit - V. Synthesis in vitro by mononuclear phagocytes from various tissues of normal and BCG-infected rabbits: *Br J Cancer* 1981; 44:418-24
86. Beutler B, Krochin N, Milsarck IW et al: Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanism of endotoxin resistance. *Science* 1986; 232:977-80
87. Wong GHW, Goeddal DV: Tumor necrosis factor alpha and beta inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature* 1986; 23:819-21
88. Hotez PJ, Le Trang N, Fairlamb AH et al: Lipoprotein lipase suppression in 3T3-L1 cells by hematoprotzoan induced mediator from peritoneal exudate cells. *Parasite Immunol* 1984; 6:203-9
89. Barraji3n E: Factor de necrosis tumoral. *Med Clin (Barc)* 1989; 93:147-55
90. Dinarello CA, Wolf SM: The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993; 328:106-13
91. Dinarello CA: Biology of interleukin 1. *FASEB J* 1988; 2:108-15
92. Gery I, Davies P, Derr J et al: Relationship between the production and release of lymphocyte-activating factor (IL-1) by murine macrophages. I. Effects of various agents. *Cell Immunol* 1981; 131:293-303
93. Fong Y, Moldawer LL, Shires T, Lowry SF: The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical surgery injury. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 170:363-78
94. Fong Y, Moldawer LL, Marano M et al: Endotoxemia elicits increased circulating β_2 -IFN/IL-6 in man: *J Immunol* 1989; 142:2321-4
95. Wong GC, Clark SC: Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. *Immunol Today* 1988; 9:137-9
96. Kishimoto T: Factors affecting B-cell growth and differentiation. *Annu Rev Immunol* 1985; 3:133-57
97. Van Snick J: Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:253-78

98. Aderka D, Le J, Vilceck J: IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced TNF production in cultured human monocytes. *J Immunol* 1989; 143:3517-23
99. Nijsten NWN, DeGroot ER, Ten Duis HJ et al: Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. *Lancet* 1987; ii:921
100. Matsumura H, Nakano M: Endotoxin-induced interferon- γ production in culture cells derived from BCG-infected C3H/HeJ mice. *J Immunol* 1988; 140:494-500
101. Ucla C, Roux-Lombard P, Fey S, Dayer J-M, Mach B: Interferon gamma drastically modifies the regulation of interleukin 1 genes by endotoxin in U937 cells. *J Clin Invest* 1990; 85:185-91
102. Valone FH, Epstein LB: Biphasic platelet-activating factor synthesis by human monocytes stimulated with IL-1- β , tumor necrosis factor, or IFN- γ . *J Immunol* 1988; 141:3945-50
103. Nakagawara A, de Santis NM, Nogueira N, Nathan CF: Lymphokines enhance de capacity of human monocytes to secrete reactive oxygen intermediates. *J Clin Invest* 1982; 70:1042-51
104. Collart MA, Belin D, Vassalli J-D, de Kossodo S, Vassalli P: γ interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin 1, and urokinase genes which are controlled by short-lived repressors. *J Exp Med* 1986; 164:2113-8
105. Finocchiaro LME, Arzt ES, Fernández-Castelo S, Criscuolo M, Finkelman S, Nahmod VE: Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: Stimulation by Interferon- γ as part of an immunomodulatory pathway. *J Interferon Res* 1988; 8:705-16
106. Shaw LM, Mercurio AM: Interferon- γ and lipopolisaccharide promote macrophage adherence to basement membrane glycoproteins. *J Exp Med* 1989; 169:303-8
107. Littman BH, Dastvan FD, Carlson PL, Sanders KM: Regulation of monocyte/macrophage C2 production and HLA-DR expression by IL-4 (BSF-1) and IFN- γ . *J Immunol* 1989; 142:520-5
108. Boraschi D, Censini S, Tagliabue A: Interferon- γ reduces macrophage-suppressive activity by inhibiting prostaglandin E₂ release and inducing interleukin-1 production. *J Immunol* 1984; 133:764-8
109. Ripoche J, Mitchell JA, Erdei A, Madin C, Moffatt B, Mokoena T, Gordon S, Sim RB: Interferon- γ induces synthesis of complement alternative pathway proteins by humans endothelial cells in culture. *J Exp Med* 1989; 168:1917-22
110. Heremans H, Van Damme J, Dillen C, Dijkmans R, Billiau A: Interferon- γ , a mediator of lethal lipopolysaccharide- induced Shwartzman-like reactions in mice.

J Exp Med 1990; 171:1853-69

111. Tzung SP, Mahl TC, Lance P, Andersen V, Cohen S: Interferon- α prevents endotoxin-induced mortality in mice. *Eur J Immunol* 1992; 22:3097-101
112. Van Damme J, Decock B, Conings R, Lenaerts JP, Opdenakker G, Billiau A: The chemotactic activity for granulocytes produced by virally infected fibroblasts is identical to monocyte-derived interleukin-8. *Eur J Immunol* 1989;19:1189-94
113. Van Damme J, Van Beeumen J, Conings R, Decock B, Billiau A: Purification of monocyte-derived granulocyte chemotactic protein interleukin-8 reveals N-terminal sequence heterogeneity similar to that of β -thromboglobulin. *Eur J Biochem* 1989; 181:337-44
114. Lowry SF: Anticytokine therapies in sepsis. *New Horizons* 1993; 1:120-6
115. Shapiro L, Gelfand JA: Cytokines and sepsis: Pathophysiology and therapy. *New Horizons* 1993; 1:13-22
116. Fisher CJ Jr, Opal SM, Dhainaut JF, et al: Influence of antitumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. *Crit Care Med* 1993; 21:318-27
117. Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, et al: Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4845-9
118. Gallin JI: Degranulating stimuli decrease the negative surface charge and increase the adhesiveness of human neutrophils. *J Clin Invest* 1980; 65:298-306
119. Koricka-Dahl M, Richardson T: Initiation of oxidative changes in foods. Symposium: oxidative changes in milk. *J Dairy Sci* 1981; 63:1181-208
120. Czegledi B, Zsoldos T, Mozsik G: Effect of PGF₂ α administered in cytoprotective and antisecretory doses on the ethanol-and HCl-induced gastric mucosal damage and superoxide activity. *Acta Physiol Hung* 1984; 64:331-7
121. McCord JM, Fridovich I: The reduction of cytochrome c by milk oxidase. *J Biol Chem* 1968; 243:5753-60
122. Grisham MB, McCord JM: Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. *Physiology of oxygen radicals. Clinical Physiology Series. American Physiological Society. Bethesda. Maryland* 1986; pp.1-18
123. Fridovich I: Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity, pp.239. In *Free radicals in biology. Vol 1. WA Pryor, ed. Academic Press, New York, NY* 1976

124. Hinder RA, Stein HJ: Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg* 1991; 126:104-5
125. Goode HF, Webster NR: Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit care* 1993; 21:1770-6
126. Itoh M, Guth PH: Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology* 1985; 88:1162-7
127. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6
128. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-42
129. Moncada S, Higgs EA: Endogenous nitric oxide: Physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:361-4
130. Hegesh E, Shiloah J: Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin Chem Acta* 1982; 125:107-15
131. Knowles RG, Moncada S: Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS* 1992; 399-402
132. Moncada S, Palmer RMG, Higgs EA: The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1988; 12:365-72
133. Currand RD, Billiar TR, Stuehr DJ: Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit protein synthesis. *Ann Surg* 1990; 212:568-75
134. Nava E, Palmer RMJ, Moncada S: Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial. *Lancet* 1991; 338:1555-8
135. Wright CE, Rees DD, Moncada S: Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 1992; 26:48-57
136. Hutcheson IR, Whittle BJR, Boughton-Smith NK: Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 101:815-20
137. Parrillo JE, Parker MM, Natanson CH, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, et al: Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113:227-42
138. De Belder AJ, Radomski MW, Why HJF, Richardson PJ, Buknall CL, Salas E, et al: Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet* 1993; 341:84-85

139. Stark ME, Szurszewski JH: Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology* 1992; 103:1928-49
140. Masuda E, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Takei Y, Tsujii M, Oshita M, Michida T, Kobayashi I, Nakama A, Fusamoto H, Kamada T: Endogenous nitric oxide modulates ethanol- induced gastric mucosal injury in rats. *Gastroenterology* 1995; 108:58-64
141. Ziegler EJ, McCutchan JA, Fierer J, Glauser MP, Sadofe JC, Douglas H, Braude AI: Treatment of gram-negative bacteriemia and shock with human antiserum to a mutant *Escherichia coli*. *N Engl J Med* 1982; 307:1225-30
142. J5 Study Group: Treatment of severe infectious purpura in children with human plasma from donors immunized with *Escherichia coli* J5: a prospective doubled-blind study. *J Infect Dis* 1992; 165:695-71
143. Baumgartner JD: Immunotherapy with antibodies to core lipopolisaccharide: a critical appraisal. *Infect Dis Clin North Am* 1991; 5:915-27
144. Wenzel RP, Andriole VT, Barlett JG, Batt MD, Bullock WE, Cobbs CG, Light B, Martin MA, Sandford J, Sande MA: Anti- endotoxin monoclonal antibodies from gram-negative sepsis: guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 1992; 14:973-6
145. Streiter RM, Remick DG, Ward PA: Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor alpha production by pentoxifylline. *Biochem Biophys Res Comm* 1988; 155:1230-6
146. Taffet SM, Singhel KJ, Overholtzer JF: Regulation of tumor necrosis factor expression in a macrophage-like cell line by lipopolysaccharide and cyclic AMP. *Cell Immunol* 1989; 120:291-300
147. Schade UF: Pentoxifylline increases survival in murine endotoxin shock and decreases formation of tumor necrosis factor. *Circ Shock* 1990; 31:171-81
148. Giroir BP, Beutler B: Effect of amrinone on tumor necrosis factor production in endotoxin shock. *Circ Shock* 1992; 36:200-7
149. Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4651-5
150. Jafari HS, McCracken GH: Sepsis and septic shock: a review for clinicians. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11:739-49
151. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S: Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; 234:470-4
152. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF,

- Cerami A: Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteriemia. *Nature* 1987; 330:662-4
153. Aiura K, Gelfand JA, Wakabayashi G: Interleukin-1 receptor antagonist blocks staphylococcal induced septic shock in rabbits. *Cytokine* 1991; 3:498
 154. Winn R, Enderson B, Price S, Rice CL: Indomethacin, but not dazoxiben, reduced lung fluid filtration after E.coli infusion. *J Appl Physiol* 1988; 64:2468-73
 155. Turner CR, Quinlan MF, Schwartz LW: Therapeutic intervention in a rat model of ARDS: I. Dual inhibition of arachidonic acid metabolism. *Circ Shock* 1990; 32:231-42
 156. Bernard GR: N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Med* 1991; 91:54-9S
 157. Geroulanos S, Schilling J, Cakmakci M, Jung HH, Lariader F: Inhibition of NO synthesis in septic shock. *Lancet* 1992; 339:435
 158. Moore JM, Earnest MA, DiSimone AG, Abumrad NN, Fletcher JR: A PAF receptor antagonist, BN 52021, attenuates thromboxane release and improves survival in lethal canine endotoxemia. *Circ Shock* 1991; 36:53-9
 159. Yue TL, Farhat M, Rabinovici R, Perera PY, Vogel SN, Feuerstein G: Protective effect of BN 50739, a new platelet-activating factor antagonist, in endotoxin-treated rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254:976-81
 160. Moody FG, Larsen KR: Acute erosions and stress ulcer. *Gastroenterology*, 4th ed. 1985:1004-12.
 161. Cheung LY: Pathophysiology of stress-induced gastric mucosal erosions. *Surg Gastroenterol* 1982; 1:235-42
 162. Silen W, Merhav A, Simson JN: The pathophysiology of stress ulcer disease. *World J Surg* 1981; 5:165-74
 163. Terés J, Bordas JM, Bosch J: Lesiones agudas de la mucosa. *Monografías clínicas en gastroenterología. Hemorragia digestiva alta*. Eds Doyma 1991; 3:49-51
 164. Balibrea Cantero JL: Ulcus de stress. *Tratado de Cirugía Tomo II*. Eds. Toray SA Barcelona 1989, 1ª Ed:2049-55
 165. Zinner JM, Zuisdema GD, Smith PL, Mignosa M: The prevention of upper gastrointestinal tract bleeding in patients in an intensive care unit. *Surg Gynecol Obstet* 1981; 153:214-20
 166. Ritchie WP Jr: Role of bile acid reflux in acute hemorrhagic gastritis. *World J Surg* 1981; 5:189-98

167. Moody FG, Zalewsky CA, Larsen KR: Cytoprotection of the gastric epithelium. *World J Surg.* 1981; 5:153-63
168. Arvidson S, Fält K, Haglund U: Acute gastric mucosal ulceration in septic shock. An experimental study on pathogenetic mechanisms. *Acta Chir Scand.* 1984; 150:541-47
169. Genter B, Stone AM, Stein TA, Wise L: Gastric mucosal blood flow and *Escherichia coli* bacteremia. *Am J Surg* 1983; 145:364-8
170. Wallace JL, Whittle BJR: Picomole doses of platelet- activating factor predispose the gastric mucosa to damage by tropical irritants. *Prostaglandins* 1986; 31:989
171. Allen A, Garner A: Mucus and bicarbonate secretion in the stomach and their possible role in mucosal protection. *Gut* 1980; 21:249-62
172. Ruiz Santana S, Ruiz Santana AJ, Manzano Alonso JL: Ulceras de estrés: fisiopatología, profilaxis y tratamiento. *Med Clin (Barc)* 1992; 99:549-55
173. Allen A, Flemström G, Garner A, Kivilaakso E: Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol Rev* 1993; 73:823-57
174. Schmitz MGJ, Renooij W: Phospholipids from rat, human, and canine gastric mucosa. *Gastroenterology* 1990; 99:1292-6
175. Wassef MK, Lin YN, Horowitz MI: Molecular species of phosphatidylcholine from rat gastric mucosa. *Biochim Biophys Acta* 1979; 573:222-6
176. Johansson C, Bergström S: Prostaglandins and protection of the gastroduodenal mucosa. *Scand J Gastroenterol* 1982; 17 (suppl 77):21-46
177. Scheiman JM, Kraus ER, Bonnville LA, Weinhold PA, Boland CR: Synthesis and prostaglandin E₂-induced secretion of surfactant phospholipid by isolated gastric mucous cells. *Gastroenterology* 1991; 100:1232-40
178. Lee M, Aldred K, Lee E, Feldman M: Aspirin-induced acute gastric mucosal injury is a neutrophil-dependent process in rats. *Am J Physiol* 1992; 26:G920-6
179. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IRS, Valeri CR, Shepro D, Hetchman B: Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78:661-5
180. Mózsik G, Sütó, Garamszegi M, Jávör T, Nagy L, Vincze A, Zsoldos T: Oxygen free radicals and gastric mucosal damage in rats treated with ethanol and HCl. *Eur J Gastroent & Hepatol* 1991; 3:757-61
181. Sullivan TR, Cordero JA, Mercer DW, Ritchie WP, Dempsey DT: Selective lipooxygenase inhibitor reduces bile acid- induced gastric mucosal injury. *J Surg*

Res 1992; 53:568- 71

182. Stuart RC, Gorey TF, Kay E, Marke P, Byrne PJ, Hennessy TPJ: Acute gastric stress ulceration: Prophylaxis with allopurinol. *J R Coll Surg Edimb* 1989; 34:321-5
183. Flynn R, Stuart RC, Gorey TF, Kay E, McBennet S, Byrne PJ, Hennessy TPJ: Stress ulceration and gastric mucosal cell kinetics: the influence of prophylaxis against acute stress ulceration. *J Surg Res* 1993; 55:188-92
184. Doebber TW, Wu MS, Robbins JC, Choy BM, Chang MN, Shen TY: Platelet activating factor involvement in endotoxin- induced hypotension in rats. Studies with PAF receptors antagonist Kadsurenone. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 127: 799-808
185. Otamiri T, Lindahl M, Tagesson C: Phospholipase A₂ inhibition prevents mucosal damage associated with small intestinal ischaemia in rats. *Gut* 1988; 29:489-94
186. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; 11:1709-15
187. Bissonnette EY, Hogaboam CM, Wallace JL, Befus AD: Potentiation of tumour necrosis factor- α -mediated cytotoxicity of mast cells by their production of nitric oxide. *J Immunol* 1991; 147:3060-5
188. Pique JM, Esplugues JV, Whittle BJR: Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilatation during acid secretion. *Gastroenterology* 1992; 102:168-74
189. Drapier JC, Hibbs JB Jr: Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumour cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* 1988; 140:2829-38
190. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA: Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991; 266:4244-50
191. Brune B, Ullrich V: Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 1987; 32:497-504
192. Wolff DG, Bidlack WR: The formation of carbon monoxide during peroxidation of microsomal lipids: *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 73:850-7
193. Welbourn CRB, Young Y: Endotoxinas, shock séptico y lesión pulmonar aguda: los neutrófilos, los macrófagos y los mediadores de la inflamación. *Br J Surg (Ed esp)* 1992; 9:64-70

194. Gustafson-Svärd C, Tagesson C, Boll RM, Kald B: Tumor necrosis factor- α potentiates phospholipase A₂-stimulated release and metabolism of arachidonic acid in cultured intestinal epithelial cells (INT407). *Scand J Gastroenterol* 1993; 28:323-30
195. Hallman MR, Spragg JH, Harrel KM, Gluck L: Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure: Study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity and plasma myoinositol. *J Clin Invest* 1982; 70:673-83
196. Vadas P, Pruzanski W: Induction of group II phospholipase A₂ expression and pathogenesis of the sepsis syndrome. *Circ Shock* 1993; 39:160-7
197. Fisher AB, Dodia C, Chander A, Jain M: A competitive inhibitor of phospholipase A₂ decreases surfactant phosphatidylcholine degradation by the rat lung. *Biochem J* 1992; 288:407-11
198. Kivilaakso E, Fromm D, Silen W: Relationship between ulceration and intramural pH of gastric mucosa during hemorrhagic shock. *Surgery* 1978; 84:70
199. Marik PE: Gastric Intramucosal pH: A better predictor of multiorgan dysfunction syndrome and death than oxygen- derived variables in patients with sepsis. *Chest* 1993;
200. Tryba M, May B: Conservative treatment of stress ulcer bleeding: A new approach. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27 (191):16-24
201. Green FW, Kaplan MM, Levine PH, et al: Effect of acid and pepsin on blood coagulation and platelet aggregation. *Gastroenterology* 1978; 74:38-43
202. Lanza FL, Sibley CM: Role of antacids in the management of disorders of the upper gastrointestinal tract. Review of clinical experience 1975-1985. *Am J Gastroenterol* 1987; 82:1223- 41
203. Priebe HJ, Skillman JJ, Bushnell LS, et al: Antacid versus cimetidine in preventing acute gastrointestinal bleeding: a randomized trial in 75 critically ill patients. *N Engl Med* 1980; 302:426-30
204. Skillman JJ, Gould SA, Chung RSK, Silen W: The gastric mucosal barrier: Clinical and experimental studies in critically ill and normal man and in the rabbit. *Ann Surg* 1970; 172:564
205. McElwee HP, Sirinek KR, Levine BA: Cimetidine affords protection equal to antacids in prevention of stress ulceration following thermal injury. *Surgery* 1979; 86:620
206. Brunner G, Chang J: Intravenous therapy with high doses of ranitidine and omeprazole in critically ill patients with bleeding peptic ulcerations of the upper

- intestinal tract; an open randomized trial. *Digestion* 1990; 45:217-25
207. Londong W, Hasford J, sander R Prevention of recurrent bleeding from gastrointestinal ulcers by combined application of cimetidine and pirenzepine: A double-blind, randomized multicenter trial: Dotevar G, editor. *Advances in gastroenterology with the selective antimuscarinic compound pirenzepine*. Amsterdam: Excerpta Medica 1982:152-3
 208. Borrero E, Bank S, Margolis I, Schulman N, Chardavoigne R: Comparison of antacid and sucralfate in the prevention of gastrointestinal bleeding in patients who are critically ill. *Am J Med* 1985; 79:62
 209. Kamada T, Fusamoto H, Kawano S, et al: Gastrointestinal bleeding following head injury: A clinical study of 433 cases. *J Trauma* 1977; 17:44
 210. Critchlow JF: Comparative efficacy of parenteral histamine (H₂)-antagonists in acid suppression for the prevention of stress ulceration. *Am J Med* 1987; 86 (6A):23-8
 211. Shuman RB, Schuster DP, Zuckerman GR: Prophylactic therapy for stress ulcer bleeding: a reappraisal. *Ann Intern Med* 1987; 106:562-7
 212. Hollander D, Tarnawski A, Krause WJ, Gergely : Protective effect of sucralfate against alcohol-induced gastric mucosal injury in the rat. Macroscopic, histologic, ultrastructural and functional time sequence analysis. *Gastroenterology* 1985; 88:366-74
 213. Shorrock CJ, Rees WDW: Effect of sucralfate on human gastric bicarbonate secretion and local prostaglandin E₂ metabolism. *Am J Med* 1989; 86 (6A):2-4
 214. Feistauer SM, Lagnner AN, Makristathis A: Influence of stress ulcer prophylaxis on translocation of bacteria from the intestinal tract in rats. *Abstr. Circ Shock* 1991; 34:25
 215. Eddleston J, Vohra A, Scott P, et al: A comparison of the frequency of stress ulceration and secondary pneumonia in sucralfate or ranitidine-treated intensive care unit patients. *Crit Care Med* 1991; 19:1491-6
 216. Eddleston JM, Holland J, Vohra A, Pearson RC, Tooth JA, Doran BH: Prospective endoscopic study of stress erosions and ulcers in critically ill adult patients treated with either sucralfate or placebo. *Crit Care Med* 1994; 12 (22):1949-54
 217. Miller TA, Jacobson ED: Gastrointestinal cytoprotection by prostaglandins. *Gut* 1979; 20:75-87
 218. Robert A: Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 1979; 77:761-7
 219. Sontag SJ: Prostaglandins and acid peptics disease. *Am J Gastroenterol* 1986;

220. Knodell RG, Garjian PL, Schreiber JB: Newer agents available for treatment of stress-related upper gastrointestinal tract mucosa. *Am J Med* 1987; 83 (6A):36-40
221. Feldman M, Burton ME: Histamine₂-receptor antagonists. Standard therapy for acid-peptic diseases (first of two parts). *N Engl Med* 1990; 323:1672-80
222. Berg P, Bär U, Hausamen TU, et al: Vergleichende behandlung gastroduodenaler blutungen mit sekretin und cimetidin. *Dtsch Med Wochenschr* 1982; 107:1831-5
223. Eckstein MR, Kelemoundis V, Athanasoulis CA, et al: Gastric bleeding therapy with intraarterial vasopresin and transcatheter embolization. *Radiology* 1984; 152:643-6
224. Stuart RC, Gorey TF, Kay E, Marks P, Byrne PJ, Hennessy TPJ: Acute gastric stress ulceration: Prophylaxis with allopurinol. *J R Coll Surg Edinb* 1989; 34:321
225. Greenburg AG, Saik R, Bell RH, Collins GM: Changing patterns of gastrointestinal bleeding. *Arch Surg* 1985; 120:341-4
226. Hoffmann H, Hatherill JR, Crowley J, Harada H, Yonemaru M, Zheng H, Ishizaka A, Raffin TA: Early post-treatment with pentoxifylline or dibutiril cAMP attenuates Escherichia coli-induced acute lung injury in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:289-93
227. Fletcher MA, McKenna TM, Owens EH, Nadkarni VM: Effects of in vivo pentoxifylline treatment on survival and ex vivo vascular contractility in a rat lipopolysaccharide shock model. *Circ Shock* 1992; 36:74-80
228. Ehrly A: The effect of pentoxifylline on the deformability of erythrocytes and the muscular oxygen pressure in patients with chronic arterial disease. *J Med* 1979; 10:331-6
229. Coccia M, Waxmasn K, Soliman H, et al: Pentoxifylline improves survival following hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 1989; 17:36-41
230. Santucci L, Fiorucci S, Giansanti M, Brunori PM, Di Mateo FM, Morelli A: Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor alpha. *Gut* 1994; 35:909-15
231. Ciuffetti G, Mercury M, Ott C, Lombardini R, Paltricia R, Lupattelli G, Santambrogio L, Mannarino E: Use of pentoxifylline as an inhibitor of free radical generation in peripheral vascular disease. *Eur J Clin Pharmacol* 1991; 41:511-5
232. Newman JB, Lluís F, Townsend CM Jr: Somatostatin En: Thompson JC, Greeley GH Jr, Rayford PL, Townsend CM Jr (Eds) *Gastrointestinal Endocrinology*. New York. McGraw-Hill Book Co., 1987:286-99

233. Blum AM, Metwali A, Mathew RC, Elliot D, Weinstock JV: Substance P and somatostatin can modulate the amount of IgG2a secreted in response to schistosome egg antigens in murine schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 1993; 151:6994- 7004
234. Baxter JM, Jenkins SA, Day DW, Shields R: Effects of a somatostatin analogue on hepatic and splenic reticuloendotelial function in the rat. *Br J Surg* 1985; 72:1005-8
235. Pawlikowski M, Stepień H, Kunert-Radek J, Zelazowski P, Schally AV: Immunomodulatory action of somatostatin. *Ann NY Acad Sci* 1987; 496:233-9
236. Bermudez LE, Wu M, Young LS: Effects of stress-related hormones on macrophage receptors and response to tumor necrosis factor. *Lymphokine Res* 1990; 9 (2):137-45
237. Karalis K, Mastorakos G, Chrousos GP, Tolis G: Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *J Clin Invest* 1994; 93:2000-6
238. Usadel KH, Schwedes U, Wdowinski JM: Pharmacological effects of somatostatin in acute organ lesions. *Inn Med* 1982; 9:204-9
239. Kusterer K, Rohr G, Schwedes U, Usadel KH, Szabo S: gastric mucosal protection by somatostatins. *Klin Wochenschr* 1986; 64 (VII):97-9
240. Torres A, Landa I, Hernández F, Jover JM, Suárez A, Arias- Díaz J, Cuberes R, Santoyo J, Fernández R, Calleja J, Nisa E, Rodríguez JL, Moreno E, Balibrea JL: Somatostatin in the treatment of severe upper gastrointestinal bleeding: A multicentre controlled trial. *Br J Surg* 1986; 73 (1):786-9
241. Antonioli A, Gandolfo M, Rigo GP, et al: Somatostatin and cimetidine in the control of acute upper gastrointestinal bleeding: a randomized multicenter study. *Hepatogastroenterology* 1986; 33:71-4
242. Sonnenberg GE, Keller V, Gyr K, et al: Effect of somatostatin on splanchnic hemodynamics in patients with cirrhosis of the liver and in normal subjects. *Gastroenterology* 1981; 80:526-32
243. Johansson C, Aly A: Stimulation of gastric mucus output by somatostatin in man. *Eur J Clin Invest* 1982; 12:37-9
244. Mason RJ, Dobbs LG: Synthesis of phosphatidylcholine by alveolar type II cells in primary culture. *J Biol Chem* 1980; 255:5101-7
245. Bartholomew B: A rapid assay of urine nitrate using the nitrate reductase enzyme of *Escherichia Coli*. *Food Chem Toxicol* 1984; 22:541-3
246. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ: Release of reactive nitrogen and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of

- activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988; 141:2407-12
247. Tepperman BL, Vozzolo BL, Soyer BD: Effect of neutropenia on gastric mucosal nitric oxide synthesis in the rat. *Dig Dis Science* 1993; 38 (11): 2056-61
 248. Saville A: A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst (London)* 1958; 83:670-2
 249. Buege JA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52:941-8
 250. Gutteridge JMC: Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation. *Free Rad Res Commun* 1986; 1:173-84
 251. Yalow RS, Berson SA, En Odell WD, Daughaday WH: Eds. Principles of competitive protein binding assays Ch1. Philadelphia, JB Lippincott Co, 1971:73-7
 252. Bradley PP, Priebat DA, Christenses RD, Rothestein G: Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78:206-9
 253. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 1976; 72:244-54
 254. Vadas P, Scott K, Smith G, Rajkovic I, Stefanski E, Schouten BD, Singh R, Pruzanski W: Serum phospholipase A₂ enzyme activity and immunoreactivity in a prospective analysis of patients with septic shock. *Life Sci* 1992; 50:807-811
 255. Yalow RS, Berson SA: Effects of X-Rays on trace-labeled I¹³¹-Insulin and its relevance to biologic studies with I¹³¹-labeled proteins. *Radiology* 1956; 66:106-9
 256. Yalow RS, Berson SA: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 1959; 184:1648-50
 257. Yalow RS, Berson SA: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 1960; 39:1157-75 1982;
 258. Tamarit-Rodríguez J, Vara E, Tamarit J: Antigenic specificity of a new and potent somatostatin antiserum. *Horm Metabol Res* 1985; 17:623-5
 259. Orchard JL, Bickerstaff CA: Gastric mucosal phospholipid concentrations in human patients with gastritis, gastric ulcer, and normals. *Gastroenterology* 1986; 90:1573

260. Balibrea JL, García-Barreno B, García-Barreno P, Municio AM: Pulmonary lung surfactant and biosynthesis in dogs under septic and hypovolemic shock syndromes. *Int J Biochem* 1979; 10:91-6
261. Arias-Díaz J, Vara E, García C, Gómez M, Balibrea JL: Tumor necrosis factor- α inhibits synthesis of surfactant by isolated human type II pneumocytes. *Eur J Surg* 1993; 159:541-9
262. Post M, Batenburg JJ, Smith BT: Pool sizes of precursors for phosphatidylcholine formation in adult rat lung type II cells. *Biochem Biophys Acta* 1984; 795:552-7
263. Haagsman HP, Schuurmans EAJM, Batenburg JJ, Van Golde LMG: Synthesis of phosphatidylcholine in ozone-exposed alveolar type II cells isolated from adult rat lung. Is glycerol phosphate acyl transferase a rat-limiting enzyme?. *Exp Lung Res* 1987; 14:1-17
264. Haagsman HP, Van Golde LMG: lung surfactant and pulmonary toxicology. *Lung* 1985; 163:275-303
265. Batenburg JJ: Surfactant phospholipids. *Am J Physiol* 1992; 262:L367-85
266. Nakano T, Arita H: Enhanced expression of group II phospholipase A₂ gene in the tissues of endotoxin shock rats and its suppression by glucocorticoids. *FEBS Lett* 1990; 273:23-6
267. Offenstandt G, Pinta P, Maslia J, Alcindor LG, Hericord P, Amstutz P: Phospholipase and phospholipasic activities in bronchoalveolar lavage fluid in severe acute pulmonary disease with or without ARDS. *Intensive Care Med* 1981; 7:285-90
268. Otamiri T, Sjödal R, Tagesson C: Lysophosphatidylcholine potentiates the increase in mucosal permeability after small intestinal ischaemia. *Scand J Gastroenterol* 1986; 21:1131-6
269. Otamiri T, Lindmark D, Frazén L, tagesson C: Increased phospholipase A₂ and decreased lysiphospholipase activity in the small intestinal mucosa after ischaemia and revascularisation. *Gut* 1988; 28:1445-53
270. Hogaboam CM, Bissonnette EY, Chin BC, Befus AD, Wallace JL: Prostaglandins inhibit inflammatory mediator release from rat mast cells. *Gastroenterology* 1993; 104:122-9
271. Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanehor AJ: Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology* 1979; 77:433-43
272. Arvidsson S, Fält K, Haglund U: Gastric mucosal damage in sepsis. Effects of

- pretreatment with a synthetic prostaglandin E₁ analogue. *Gut* 1985; 26:1025-31
273. Shiratori K, Watanabe S, Takeuchi T: Role of gastric mucosal prostaglandin E₂ in the inhibitory action of secretin and somatostatin on gastric acid secretion in the rat. *Digestion* 1993; 54:163-7
 274. Samuelsson B: Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983; 220:568
 275. Karmeli F, Eliakim R, Okon E, Rachmilewitz D: Somatostatin effectively prevents ethanol- and NSAID- induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sciences* 1994; 39:617-25
 276. Force T, Milani R, Hibberd P, Lorenz R, Uedelhoven W, Leaf A, Weber P: Aspirin-induced decline in prostacyclin production in patients with coronary artery disease is due to decreased endoperoxide shift. *Circulation* 1991; 84:2286-93
 277. FitzGerald G, Smith B, pedersen A, Brash A: Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *N Engl J Med* 1984; 310:1065-8
 278. Knapp H, Reilly I, Alessandrini P, FitzGerald G: In vivo indexes of platelet and vascular function during fish- oil administration in patients with atherosclerosis. *N Engl J Med* 1986; 314:937-42
 279. Tagesson C, Stendahl O, Magnusson KE, Edebo L: Desintegration of single cells in suspension. Isolation of rabbit polymorphonuclear leukocyte granules. *Acta Path Microbiol Scand sect B* 1973; 81:464-72
 280. Ivey KJ: Acute hemorrhagic gastritis: modern concepts based on pathogenesis. *Gut* 1971; 12:750-3
 281. Skillman JJ, Gould SA, Chung RSK, Silen W: The gastric mucosal barrier: clinical and experimental studies in critically ill and normal man, and in the rabbit. *Ann Surg* 1970; 172:564-84
 282. Goodman AA, Osborne MP: An experimental model and clinical definition of stress ulceration. *Surg Gynecol Obstet* 1972; 134:563-71
 283. Starlinger M, Jakesz R, Matthews B, Yoon Ch, Schiessel R: The relative importance of HCO₃ and blood flow in the protection of rat gastric mucosa during shock. *Gastroenterology* 1981; 81:732-5
 284. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR, McCord JM: Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 1982; 82:9-15

285. Granger DN, Rutili G, McCord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; 81:22-9
286. Parks DA, Granger DN: Ischemia-induced microvascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983; 245:G285-9
287. Ogino K, Oka S, Okazaki Y, Takemoto T: Gastric mucosal protection and superoxide dismutase. *J Clin Gastroenterol* 1988; (suppl 1):S129-32
288. Fridovich I: The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity: superoxide dismutases provide an important defense. *Science* 1978; 201:875-80
289. Crowell JW, Jones CE, Smith EE: Effect of allopurinol on hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1969; 216:774-8
290. Menguy R, Desbaillets L, Masters YF: Mechanisms of stress ulcer: influence of hypovolemic shock on energy metabolism in the gastric mucosa. *Gastroenterology* 1974; 66:46-55
291. Zoller I, Asakawa H, Karacsonyi S: Histamine release and SOD, allopurinol and ranitidine pretreatment in haemorrhagic shock in the rat. *Acta Physiol Hung* 1992; 80 (1-4):303-9
292. Del Maestro, Thaw HH, Bjork J, Planker M, Arfors KE: free radicals mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand* 1980; (suppl)492:43-57
293. McCord JM: Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 1974; 185:529-31
294. Romero Alvira D, Villalba Martín M^aP, Gómez Bellver M^aJ y cols.: Interés de los fármacos antioxidantes en la terapéutica actual. Radicales libres de oxígeno, antioxidantes y patología. *Rev Soc Esp Farm Hosp* 1989; XIII (4):317-27
295. Butterfield JD, McGraw CP: Free radical pathology. *Stroke* 1978; 9:443-5
296. Fridovich I: the biology of oxygen radicals. The sulfoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutase provides an important defense. *Science* 1978; 201:875-80
297. Fong KL, Mc Kay PB, Poyer JL, Keele BB, Migra H: Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. *J Biol Chem* 1973; 248:7792-7
298. Rao P, Cohen M, Mueller H: Production of free radicals and lipid peroxides in early experimental myocardial ischaemia. *J Moll Cell Cardiol* 1983; 15:713-6

299. Mavone G, Fimiani B, Torella G, Poto S, Bianco P, Condorelli M: Possible role of arachidonic acid and of phospholipase A₂ in the control of lysosomal enzyme release from human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Lab Immunol* 1983; 12:111-6
300. Li T, Zhang XJ: Protective effect of somatostatin against stress injury of gastric mucosa may be related to the scavenge of free radicals. *Sheng Li Hsueh Pao* 1994; 46(4):369-74
301. Lorente JA, Landín L, Renes E, de Pablo R, Jorge P, Ródena E, Liste D: Role of nitric oxide in the hemodynamic changes of sepsis. *Crit Care Med* 1993; 21:759-67
302. Walder CE, Thiernemann C, Vane JR: Endothelium-derived relaxing factor participates in the increased blood flow in response to pentagastrin in the rat stomach mucosa. *Proc Roy Soc Lond (Biol)* 1990; 241:195-200
303. MacNaughton WK, Cirino G, Wallace JL: Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. *Life Sci* 1989; 45:1869-76
304. Whittle BRJ, López-Belmonte J, Moncada S: Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 99:607-11
305. Moreno JJ, Pryor WA: Inactivation of α_1 -proteinase inhibitor by peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1992; 5:425-31
306. Hu P, Zhu L, Ischiropoulos H, Matalon S: Peroxynitrite inhibition of oxygen consumption and ion transport in alveolar type II pneumocytes. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:568-73
307. Gómez Jiménez J, Salgado Remigio A: Oxido nítrico y sepsis. *Med Clin (Barc)* 1993; 101:741-2
308. Förstermann U, Nakane M, Tracey R, Pollock JS: Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J* 1993; 14(suppl 1):10- 5
309. Rossaint R: Nitric oxide: a new area in intensive care. *Presse Med* 1994; 23:855-8
310. Takeuchi K, Takeara K, Kaneko T, Susumo O: Nitric oxide and prostaglandins in regulation of acid secretory response in rat stomach following injury. *J Pharm Exp Therap* 1995; 272:357-63
311. McMillan K, Brecht DS, Hirsch DJ, Snyder SH, Clark JE, Masters BS: Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992;

- 89:1141-5
312. Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnet G, Synder SH: Carbon monoxide: A putative neural messenger. *Science* 1993; 259:381-4
 313. Schmidt HHHW: No, Co, and OH. Endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. *FEBS* 1992; 307 (1):102-7
 314. Gräser T, Vedernikov YP, Li DS: Study on the mechanism of carbon monoxide induced endothelium-independent relaxation in porcine coronary artery and vein. *Biomed Biochim Acta* 1990; 49 (4):293-6
 315. Omura T, Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964; 239 (7):2370-85
 316. Maines MD: Heme oxygenase function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 1988; 2:2557-68
 317. Keyse SM, Tyrrell RM: Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:99-103
 318. Lautier D, Luscher P, Tyrrell RM: Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis* 1992; 13:227- 32
 319. Cantoni L, Rossi C, Rizzardini M, Gadina M, Ghezzi P: Interleukin-1 and tumour necrosis factor induce hepatic haemoxygenase. *Biochem J* 1991; 279:891-4
 320. Gemsa D, Woo CH, Fudenberg HH, Schmid R: Stimulation of heme oxygenase in macrophages and liver by endotoxin. *J Clin Invest* 1974; 53:647-51
 321. Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Wogensen LD, Molvig J, Poriot F, Johannesen J, Nerup J: Cytokines and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic beta cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 164:169-93
 322. Cadenas E: Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989; 58:79-110
 323. Arnold WP, Mittal C, Katsuni S, Murad F: Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:3203-7
 324. Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F: Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 1977; 3:23-5

325. Pandol SJ, Schoffield-Payne MS: Cyclic GMP mediates the agonist-stimulated increase in plasma membrane calcium entry in the pancreatic acinar cell. *J Biol Chem* 1990; 265:12846-53
326. Chakraborti S, Gurtner GH, Michael JR: Oxidant mediate activation of phospholipase A₂ in pulmonary endothelium. *Am J Physiol* 1989; 257:L430-7
327. Elliot SJ, schilling WP: Oxidative stress inhibits bradikininin-stimulated ⁴⁵Ca²⁺ flux in pulmonary vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1991; 260:H549-56
328. Hirosumi J, Ouchi Y, Watanabe M, Kusunoki J, Nakamura T, Orimo H: Effect of superoxide and lipid peroxide on cytosolic free calcium concentration in cultured pig aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 152:301-7
329. Schilling WP, Elliot SJ: Ca²⁺ signaling mechanisms of vascular endothelial cells and their role in oxidant- induced endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol* 1992; 262:H1617-30
330. Renz H, Gong JH, Schmidt A, Nain M, Gemsa D: release of tumor necrosis factor- α from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E₂ and cyclic nucleotides. *J Immunol* 1988; 141:2388-93
331. Balibrea JL, Arias Díaz J, García C, Vara E: Effect of pentoxifylline and somatostatin on tumour necrosis factor production by human pulmonary macrophages. *Circ Shock* 1994; 43 (2):51-6
332. Balint GA: Gastric-antiulcerogenic drug effect. A possible mechanism of its molecular basis. *Acta Physiol Hung* 1992; 80 (1-4):81-8
333. Lucey MR, Yamada T: Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin. *Dig Dis Sci* 1989; 34;S5- 13
334. Barros AAJ, Bloom SR, Baron JH: Direct inhibition of gastric acid by growth hormone-release inhibiting hormone in dogs. *Lancet* 1975; 1:886-8
335. Kondo S, Shinomura Y, Kanayama S, Kawabata S, Miyazaki Y, Imamura I, Fukui H, Matsuzawa Y: Somatostatin inhibits astrin-induced histamina secretion and synthesis in the rat. *Regul Pept* 1993; 48 (3):373-80
336. Makhlof GM, Schubert ML: Gastric somatostatin: A paracrine regulator of acid secretion. *Metabolism* 1990; 39(suppl 2):138-42
337. Makhlof GM: Antral somatostatin: A paracrine regulator of gastrin secretion. In S Reichlin (ed). *Somatostatin*. New York, Plenum Press 1987:239-81
338. Schubert ML, Shamburek RD: Control of acid secretion. *Gastroenterol Clin N*

Am 1990; 19:1-25

339. Schwedes U, Usadel KH, Szabo S: Cysteamine-induced duodenal ulcer: prevention by somatostatin (SRIF). *Eur J Pharmacol* 1977; 44:195-6
340. Szabo S, Usadel KH: Cytoprotection-organoprotection by somatostatin: gastric and hepatic lesions. *Experientia* 1982; 38:254-6
341. Romano M, Razandi M, Ivey KJ: Somatostatin stimulates prostaglandin production by rat gastric epithelial cells in vitro, but is not cytoprotective. *Dig Dis Sci* 1988; 33:1435-40
342. Omura N: Effect of indomethacin on endocrine kinetics of the stomach in experimental pyloric stenosis model. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 1993; 90 (1):16-23
343. Wallace JL, Boichot E, Sidoti C, Brex A, Paubert- Braquet M: Protective effects of somatostatin against gastric damage induced by hemorrhagic shock, stress and PAF in the rat. *Regul Pept* 1993; 47 (2):195-203
344. Poggesisi L, Boddi M, Scanti A, Masotti G: Pentoxifylline and prostaglandins. *Ric Clin Lab* 1988; 18 (2):37
345. Bessler H, Gilgal R, Djaldetti M, Zahavi I: Effect of pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells. *J Leukocyte Biol* 1986; 40:747- 54
346. Bianco JA, Appelbaum FR, Nemunaitis J, Almgren J, Andrews F, Kettner P, Shields A, Singer JW: Phase I-II trial of pentoxifylline for the prevention of transplant-related toxicities following bone marrow transplantation. *Blood* 1991; 5 (78):1205-11
347. Mandell GL: SDRA, neutrophils and pentoxifylline. *Am Rev Respir dis* 1988; 138:1103-5
348. Endres S, Fülle H-J, Sinha B, Stoll D, Dinarello CA, Gerzer R, Weber PC: Cyclic nucleotides differentially regulate the synthesis of tumor necrosis factor- α and interleukin 1β by human mononuclear cells. *Immunology* 1991; 72:56-60
349. Zheng H, Crowley JJ, Chang JC, Hoffmann H, Hatherill JR, Ishizaka A, Raffin TA: Attenuation of tumor necrosis factor-induced endothelial cell cytotoxicity and neutrophil chemiluminescence. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:1073-8
350. Balibrea-Cantero JL, Arias-Díaz J, García C, Torres- Melero J, Simón C, Rodríguez JM, Vara E: Effect of pentoxifylline on the inhibition of surfactant synthesis induced by TNF- α in human type II pneumocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:699-706

351. Stefanovitch V: Concerning specificity of the influence of pentoxifylline on various cyclic AMP phosphodiesterases. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1974; 8:673-80
352. Farruck IS, Gurtner GH, Michael JR: Pharmacological modification of pulmonary vascular injury: Possible role of cAMP. *J Appl Physiol* 1987; 62:47-54
353. Matzki R, Darius H, Schrör K: The release of prostacycline (PGI₂) by pentoxifylline from human vascular tissues. *Arzneimittelforschung* 1982; 32:1315-8
354. Miyazawa Y, Hiramoto M, Hiramoto T, Nishida O: Reversal of oleic acid induced respiratory distress by prostacyclin (PGI). *Respir Physiol* 1982; 47:351-64
355. Tsujimoto M, Yokota S, Vilsek J, Weissmann G: Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 137:1094-100
356. Yamauchi N, Watanabe N, Kusiyaama H, Neda H, Maeda M, Himeno T, Tsuji Y, Nitsu Y: Suppressive effects of intracellular glutathione on hydroxyl radical production induced by tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 1990; 46:884-8
357. Youn Y, Knox J, Lalonde Ch, Demling R: Pentoxifylline does not prevent induced lung and liver lipid peroxidation in adult sheep. *Circ Shock* 1993; 39:39-43
358. Rossignol L, Plantavid M, Chap H, Douste-Blazy L: effects of two methylxanthines, pentoxifylline and propentofylline, on arachidonic acid metabolism in platelets stimulated by thrombin. *Biochem Pharmacol* 1988; 37 (17):3229-3612:37-9