

**ACTA**

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS**

*Título: "Estrés nitroxidativo pulmonar y sistémico en pacientes en ventilación mecánica con sepsis sin lesión pulmonar aguda y en pacientes en ventilación mecánica sin sepsis"*

***De: Dr. José Gorrasi***

**19 de agosto de 2020**

**Hora: 9:30**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL:**

Presidente Dr. Arturo Briva  
Dra. Lucía Turell  
Dr. Nicolás Nin

**Directores Académicos:**

Dres. Rafael Radi y Humberto Correa

Fallo del Tribunal Nota<sup>1</sup> EXCELENTE Escala numérica<sup>2</sup>: 11 -

**JUICIO COMPLEMENTARIO ESCRITO (HASTA UN MÁXIMO DE 300 PALABRAS)**

El Programa de Investigación Biomédica (PROINBIO) ha recibido la solicitud de Defensa de Tesis de Doctorado del Dr Jose Gorrasi. La misma cuenta con el aval de sus tutores (Prof Rafael radi y Prof Humberto Correa) y ha cumplido con todos los requisitos administrativos y académicos para acceder a esta etapa de evaluación.

Se conformó el Tribunal de Defensa integrado por los Dres Arturo Briva, Leticia Turel y Nicolás Nin quienes han evaluado el material presentado por el Dr Gorrasi y han asistido hoy a la instancia formal de Defensa Pública de tesis.

(a)<sup>1</sup>Excelente. Muy satisfactorio. Satisfactorio. Aceptable y No aprobado.

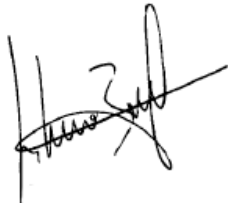
(b)<sup>2</sup>Utilizar escala de 1 al 12

---

El Dr Gorrasi ha presentado hoy su trabajo "*Estrés nitrooxidativo pulmonar y sistémico en pacientes en ventilación mecánica con sepsis sin lesión pulmonar aguda y en pacientes en ventilación mecánica sin sepsis*"

El mismo ha demostrado una gran cantidad de datos que han merecido su publicación en una revista de muy alto impacto para la medicina intensiva y demuestra un enorme trabajo de tipo traslacional que nos enorgullece como colegas e integrantes de la comunidad científica nacional. Debemos destacar además que si bien el trabajo presenta ciertas debilidades y aspectos a mejorar estos han sido claramente expuestos en la presentación y no impiden que cataloguemos como excelente el producto final presentado.

Por este motivo definimos de comun acuerdo otorgar 11 puntos y el grado de excelente a la presente defensa



Dr Arturo Briva

FIRMA DE LOS INTEGRANTES DEL TRIBUNAL.



## ACTA

### TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

Título: *"Estrés nitrooxidativo pulmonar y sistémico en pacientes en ventilación mecánica con sepsis sin lesión pulmonar aguda y en pacientes en ventilación mecánica sin sepsis"*

**De: Dr. José Gorrasi**

**19 de agosto de 2020**

**Hora: 9:30**

#### **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL:**

Presidente Dr. Arturo Briva  
Dra. Lucía Turell  
Dr. Nicolás Nin

#### **Directores Académicos:**

Dres. Rafael Radi y Humerto Correa

Fallo del Tribunal Nota<sup>1</sup> EXCELENTE Escala numérica<sup>2</sup>: 11-

#### **JUICIO COMPLEMENTARIO ESCRITO (HASTA UN MÁXIMO DE 300 PALABRAS)**

El Programa de Investigación Biomédica (PROINBIO) ha recibido la solicitud de Defensa de Tesis de Doctorado del Dr Jose Gorrasi. La misma cuenta con el aval de sus tutores (Prof Rafael radi y Prof Humberto Correa) y ha cumplido con todos los requisitos administrativos y académicos para acceder a esta etapa de evaluación.

Se conformó el Tribunal de Defensa integrado por los Dres Arturo Briva, Leticia Turel y Nicolás Nin quienes han evaluado el material presentado por el Dr Gorrasi y han asistido hoy a la instancia formal de Defensa Pública de tesis.

---

<sup>1</sup>a)Excelente. Muy satisfactorio. Satisfactorio. Aceptable y No aprobado.

<sup>2</sup>b) Utilizar escala de 1 al 12

---

El Dr Gorrasi ha presentado hoy su trabajo "*Estrés nitrooxidativo pulmonar y sistémico en pacientes en ventilación mecánica con sepsis sin lesión pulmonar aguda y en pacientes en ventilación mecánica sin sepsis*"

El mismo ha demostrado una gran cantidad de datos que han merecido su publicación en una revista de muy alto impacto para la medicina intensiva y demuestra un enorme trabajo de tipo traslacional que nos enorgullece como colegas e integrantes de la comunidad científica nacional. Debemos destacar además que si bien el trabajo presenta ciertas debilidades y aspectos a mejorar estos han sido claramente expuestos en la presentación y no impiden que cataloguemos como excelente el producto final presentado.

Por este motivo definimos de común acuerdo otorgar 11 puntos y el grado de excelente a la presente defensa

FIRMA DE LOS INTEGRANTES DEL TRIBUNAL.



NICOLAS NIN

**ACTA**

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS**

Título: *"Estrés nitroxidativo pulmonar y sistémico en pacientes en ventilación mecánica con sepsis sin lesión pulmonar aguda y en pacientes en ventilación mecánica sin sepsis"*

**De: Dr. José Gorrasi**

**19 de agosto de 2020  
Hora: 9:30**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL:**

Presidente Dr. Arturo Briva  
Dra. Lucía Turell  
Dr. Nicolás Nin

**Directores Académicos:**

Dres. Rafael Radi y Humerto Correa

Fallo del Tribunal Nota<sup>1</sup> EXCELENTE Escala numérica<sup>2</sup>: 11-

**JUICIO COMPLEMENTARIO ESCRITO (HASTA UN MÁXIMO DE 300 PALABRAS)**

El Programa de Investigación Biomédica (PROINBIO) ha recibido la solicitud de Defensa de Tesis de Doctorado del Dr Jose Gorrasi. La misma cuenta con el aval de sus tutores (Prof Rafael radi y Prof Humberto Correa) y ha cumplido con todos los requisitos administrativos y académicos para acceder a esta etapa de evaluación.

Se conformó el Tribunal de Defensa integrado por los Dres Arturo Briva, Leticia Turel y Nicolás Nin quienes han evaluado el material presentado por el Dr Gorrasi y han asistido hoy a la instancia formal de Defensa Pública de tesis.

El Dr Gorrasi ha presentado hoy su trabajo "*Estrés nitroxidativo pulmonar y sistémico en pacientes en ventilación mecánica con sepsis sin lesión pulmonar aguda y en pacientes en ventilación mecánica sin sepsis*"

---

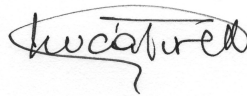
<sup>1</sup>a)Excelente. Muy satisfactorio. Satisfactorio. Aceptable y No aprobado.

<sup>2</sup>b) Utilizar escala de 1 al 12

El mismo ha demostrado una gran cantidad de datos que han merecido su publicación en una revista de muy alto impacto para la medicina intensiva y demuestra un enorme trabajo de tipo traslacional que nos enorgullece como colegas e integrantes de la comunidad científica nacional. Debemos destacar además que si bien el trabajo presenta ciertas debilidades y aspectos a mejorar estos han sido claramente expuestos en la presentación y no impiden que cataloguemos como excelente el producto final presentado.

Por este motivo definimos de común acuerdo otorgar 11 puntos y el grado de excelente a la presente defensa

FIRMA DE LOS INTEGRANTES DEL TRIBUNAL.



Dra. Lucía Turell



**Estrés nitrooxidativo pulmonar y sistémico en pacientes en ventilación mecánica con sepsis sin lesión pulmonar aguda y en pacientes en ventilación mecánica sin sepsis**

José Gorrasi

Programa de posgrado. Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Escuela de Graduados. Centro de investigaciones biomédicas en radicales libres. Centro de tratamiento intensivo.

Facultad de Medicina. Universidad de la República

Montevideo

2019



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



# **Estrés nitrooxidativo pulmonar y sistémico en pacientes con sepsis sin injuria pulmonar aguda y en pacientes en ventilación mecánica**

José Gorrasi

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de Doctor en Ciencias Biomédicas en el marco del Programa Investigaciones Biomédicas (PROINBIO).

Tutores

Dr. Rafael Radi, MD, PhD

Profesor Director Departamento de Bioquímica

Dr. Humberto Correa, MD

Decano Facultad de Medicina.

Centro Latinoamericano de Economía Humana

Ex Profesor Director Centro de Tratamiento Intensivo. Facultad de Medicina. Universidad de la República.

Montevideo, Abril 2019



Instituciones participantes:

Departamento de Emergencia, Facultad de Medicina, Universidad de la República,  
Montevideo, Uruguay.

Centro de Tratamiento Intensivo, Facultad de Medicina, Universidad de la República,  
Montevideo, Uruguay.

Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República,  
Montevideo, Uruguay.

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República,  
Montevideo, Uruguay.

Institut Pasteur. Montevideo, Uruguay.

Cátedra de Reumatología, Facultad de Medicina, Montevideo.

Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina, Universidad de la  
República, Montevideo, Uruguay.

Facultad de Medicina, Centro Latinoamericano de Economía Humana, Maldonado,  
Uruguay

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Referencias según: *International Commitee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Guía para la elaboración de tesis de posgrado. UDELAR. Facultad de Medicina. Agosto de 2016. Documento elaborado por Virginia Bertolotti, Macarena González Zunini y Carolina Oggiani.

Abreviaturas según: *List of Journals Indexed in Index Medicus*

## DEDICATORIA

*A mi esposa Virginia Elizabeth Oxley Tabarez por su infinito amor, armonía e inspiración. A mis padres por su ejemplo de vida.*

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. ....	32
Figura 2. ....	33
Figura 3. ....	35
Figura 4. ....	37
Figura 5. ....	38
Figura 6. ....	39
Figura 7. ....	40
Figura 8. ....	41
Figura 9. ....	46
Figura 10. ....	47
Figura 11. ....	49
Figura 12. ....	63
Figura 13. ....	68
Figura 14. ....	70
Figura 15. ....	71
Figura 16. ....	72

Figura 17. ....	76
Figura 18. ....	78
Figura 19. ....	79
Figura 20. ....	86
Figura 21. ....	87
Figura 22. ....	88
Figura 23. ....	89
Figura 24. ....	90
Figura 25. ....	91
Figura 26. ....	92
Figura 27. ....	96
Figura 28. ....	99
Figura 29.....	103
Figura 30.....	110
Tabla 1.....	81
Tabla 2.....	84
Tabla 3.....	94

Tabla 4.....	95
Tabla 5.....	98
Tabla 6.....	99

## **ABREVIATURAS EN CASTELLANO**

APACHE II; Evaluación del estado fisiológico agudo y estado de salud crónica

SDRA, síndrome distress respiratorio agudo del adulto

AUC, área bajo la curva

ADN, ácido desoxirribonucleico

ARM, asistencia respiratoria mecánica

APC, proteína C activada

AH, ácido ascórbico

A•, radical ascórbil

α-TOH, alfa-tocoferol

BCA, ácido bescinconínico

BHT, hidroxitolueno butilado

BSA, albumina sérica bovina

CC-16, proteína secretora 16

CH<sub>2</sub>, grupo metileno

CO<sub>2</sub>, anhídrido carbónico

CO<sub>3</sub><sup>•-</sup>, radical carbonato

CP, cisteína peroxidatíca

CR, cisteína de resolución

Cys/Sec, cisteína/ selenocisteína

EDRF, factor vasorelajante derivado del endotelio

ELISA, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (enzyme linked immunoadsorbent assay)

EPA, ácido eicosapentanoico

ERO, especies reactivas del oxígeno

ERN, especies reactivas del nitrógeno

ε, épsilon constante de absorbancia molar

FP, falso positivo

FN, falso negativo

FIO<sub>2</sub>, fracción de oxígeno inspirada

FMO, falla multiorgánica

GMPc, guanosil monofosfato ciclico

GPx, glutati3n peroxidasa

GSH, glutation

GSSG, glutati3n oxidado

GS, grupo sepsis

GCBQ, grupo control block quir3rgico

HPLC, cromatograf3a l3quida de alta presi3n

Hb, hemoglobina

HbO<sub>2</sub>, hemoglobina oxigenada

HOCl, acido hipocloroso

HNO<sub>2</sub>, 3cido nitroso

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, per3xido de hidr3geno

HNE, hidroxinonenal

IAM, infarto agudo de miocardio

IC, intervalo de confianza

ICAM, mol3cula de adhesi3n intercelular

IFN- $\gamma$ , Interferon-gamma



Ig G, inmunoglobulina G

KGF, factor de crecimiento de queratinocitos

KL-6, factor Krebs Lungen-6

LBA, lavado bronquiolo alveolar

LISS, escala de severidad de injuria pulmonar de Murray

LDL, lipoproteína de baja densidad

LPA, lesión pulmonar aguda

LO, alcoxilo

LOO, lipoperoxilo

LOOH, hidroperóxido lipídico

LOONO<sub>2</sub>, lipoperóxido nitrado

LONOO, ácido nitroleico nitrado

LNO<sub>2</sub>, ácido linoleico

LH, lípido

L•, radical lipídico

LR+, cociente de probabilidad positiva

LR-, cociente de probabilidad negativa

mM, milimolar

$\mu$ M, micromolar

MODS, escala de disfunción orgánica múltiple

MDA, malondialdehído

MDA-TBA, aducto malodialdehido acido tiobarbitúrico

MIF, factor inhibitorio de macrofagos

MA, macrófago alveolar

MPO, mieloperoxidasa

MMP-9, metaloproteinasa 9

MODS, score de disfuncion orgánica múltiple

MIDAS, detección y secuenciado iniciado por monitoreo de reacción multiple

NADPH, nicotin adenin dinucleotido reducido

NADP<sup>+</sup>, nicotin adenin dinucleotido oxidado

NO<sub>x</sub><sup>-</sup>, Nitrito más nitrato

•NO, óxido nítrico

3-NT, 3-nitrotirosina

•NO<sub>2</sub>, dióxido de nitrógeno

NOS, sintetasa del óxido nítrico

$\text{NO}_2^-$ , nitrito

$\text{NO}_3^-$ , nitrato

$\text{N}_2\text{O}_3$ , trióxido de nitrogéno

$\text{N}_2\text{O}_4$ , tetroxido de nitrogéno

$\text{NO}_2$ , dióxido de nitrogéno

$\text{NaNO}_2$ , nitrito de sodio

NED, naftiletilendiamina

nm, nanometro

nM, nanomolar

$\text{O}_2^{\bullet-}$ , radical superóxido

$\bullet\text{OH}$ , radical hidroxilo

$\text{ONOO}^-$ , peroxinitrito

$\text{ONOOH}$ , ácido peroxinitroso

OR, odds ratio

PAF, factor de activación plaquetaria

PAR, relación de frecuencia cardiaca ajustada por presión arterial y presión venosa central

PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, presión parcial de oxígeno/fracción de oxígeno inspirada

PEEP, presión positiva de fin de espiración

PGF<sub>2α</sub>, prostaglandina F-2 alfa

pKa, punto de disociación ácido

Prx, peroxiredoxina

PVC, presión venosa central

PBS, buffer salino de fosfato

PAI-1, activador del inhibidor del plasminogeno-1

PCP, presión capilar pulmonar

PMN, polimorfonuclear

PUFA, ácidos grasos libres polinsaturados

RCP, reanimación cardiopulmonar

ProCP, procolágeno

R•, radical

RH, molécula reducida

RL, radicales libres

RSSR, puente disulfuro

RSOH, sulfénico

RSH, sulfidrilo

Rd, reductor

ROC, curva ROC (curva característica del funcionamiento del receptor)

SDRA, síndrome distress respiratorio agudo

SDRA/LPA, síndrome distress respiratorio agudo/lesión pulmonar aguda

SIDA, síndrome de inmunodeficiencia adquirido

SOFA, escala de evaluación secuencial de la falla orgánica

SOD, superóxido dismutasa

SP-D, surfactante pulmonar D

SP-A, surfactante pulmonar A

SP-B, surfactante pulmonar B

Se-GPx, glutatión peroxidasa Selenio dependiente

SIN-1, 3-morfolinosisidnonimina

SA, sulfanilamida

Trx, tioredoxina

Trx<sub>red</sub>, tioredoxina reducida

Trx<sub>oxid</sub>, tioredoxina oxidada

Tyr, tirosina

Tyr•, radical tirosilo

TMP, tetrametoxipropano

TBA, ácido tiobarbitúrico

UCI, unidad de cuidado intensivo

UFC, unidad formadora de colonio

VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial

VP, verdadero positivo

VM, ventilación mecánica

VN, verdadero negativo

VPP, valor predictivo positivo

VPN, valor predictivo negativo

VCl<sub>3</sub>, cloruro de Vanadio

VM, ventilación mecánica,

## **ABREVIATURAS EN INGLÉS**

APACHE II, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation

ARDS, acute respiratory distress syndrome

AUC, area under the curve

BAL, bronchoalveolar lavage

BALF, bronchoalveolar lavage fluid

CVP, central venous pressure

CI, confidence interval

ELISA, enzyme linked immunoadsorbent assay

FIO<sub>2</sub>, fraction of inspired oxygen

HPLC, high pressure liquid chromatography

ICU, intensive care unit

LISS, lung injury severity score

MODS, multiple organ dysfunction score

NO<sub>x</sub><sup>-</sup>, Nitrite plus nitrate

•NO, nitric oxide

MDA, malondialdehyde

MIDAS, multiple reaction monitoring-initiated detection and sequencing

MV, mechanical ventilation,

nm, nanomolar

ONOO<sup>-</sup>, peroxyneitrite

ORCG, operating room control group

PAR, pressure adjusted heart rate ratio

PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, partial pressure of oxygen/fraction of inspired oxygen

PEEP, positive end expiratory pressure

ROC, receiver operator curve

SG, sepsis group

SOFA, sequential organ failure assessment



## I. RESUMEN

Propósito: Durante la sepsis y la ventilación mecánica, se genera estrés oxidativo por activación de las células pulmonares endoteliales e inflamatorias y producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Nuestro principal objetivo fue estudiar la producción pulmonar y sistémica de óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) y oxidantes derivados del  $\bullet\text{NO}$  que generan estrés nitroxidativo y su relación con la lesión pulmonar aguda (LPA) en pacientes en ventilación mecánica sépticos y no sépticos. Métodos: estudiamos 69 pacientes ventilados mecánicamente, de estos 36 pacientes con sepsis y 33 pacientes sin sepsis. Los pacientes fueron estudiados dentro de las primeras 48 horas de ingreso a unidad de cuidado intensivo (UCI). La producción de estrés nitroxidativo se comparó entre los pacientes con sepsis y los pacientes ventilados mecánicamente sin sepsis (VM). Ocho pacientes de quirófano sin enfermedad pulmonar sirvieron como grupo de control sano (GCBQ). Se analizaron nitrito más nitrato ( $\text{NO}_x^-$ ), 3-nitrotirosina (3-NT) y malondialdehído (MDA) en líquido de lavado bronquioloalveolar (LBA). En plasma se midió  $\text{NO}_x^-$  (n=69). Adicionalmente en plasma se midió 3-NT, MDA, y alfa tocoferol ( $\alpha\text{-TOH}$ ). Resultados:  $\text{NO}_x^-$ , 3-NT, MDA en LBA y  $\text{NO}_x^-$  y  $\alpha\text{-TOH}$  en plasma fueron mayores en pacientes con sepsis que en los pacientes con VM sin sepsis (todos  $p < 0,05$ ). Tanto los pacientes con sepsis como VM tenían concentración de  $\text{NO}_x^-$  en LBA mayor que el grupo de control sano ( $p < 0,001$ ). En los pacientes con sepsis, los pacientes que fallecieron en la UCI tuvieron concentraciones mayores de  $\text{NO}_x^-$  en LBA que los sobrevivientes en la UCI, 80 (70 - 127)  $\mu\text{M}$  en comparación con 31 (15 - 47)  $\mu\text{M}$ , respectivamente,  $p < 0,001$ . Los pacientes con síndrome de distress respiratorio agudo (SDRA) en el grupo sepsis tuvieron mayor concentración de  $\text{NO}_x^-$  en LBA. Conclusiones: Durante las fases tempranas de la sepsis y la ventilación

mecánica hay aumento del estrés nitroxidativo pulmonar y sistémico debido a un aumento de la producción de  $\bullet\text{NO}$  que conduce a oxidantes secundarios derivados del  $\bullet\text{NO}$ , los que promueven la nitración de proteínas y la peroxidación de lípidos. Esto se asocia con SDRA/LPA y aumento de la mortalidad en UCI.

## Abstract

**Purpose:** During sepsis and mechanical ventilation oxidative stress is generated by endothelial and inflammatory lung cells. Our main objective was to study pulmonary and systemic  $\bullet\text{NO}$  (nitric oxide) production and nitroxidative stress in mechanically-ventilated septic patients. **Methods:** we study 69 mechanically ventilated patients, 36 with sepsis and 33 without sepsis within the first 48 hours of ICU admission compared with 33 mechanically ventilated patients without sepsis (MV) plus eight operating room patients without lung disease served as control healthy group (ORCG). Nitrite plus nitrate ( $\text{NO}_x^-$ ), 3-nitrotyrosine (3-NT) and malondialdehyde (MDA) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were analyzed. Additionally, we measured plasma alpha tocopherol ( $\alpha\text{-TOH}$ ), MDA, and 3-NT. **Results:** BALF  $\text{NO}_x^-$ , BALF 3-NT, BALF MDA, and plasma  $\text{NO}_x^-$  were higher in the Sepsis than in MV patients (all  $p < 0.05$ ). Both SG and MV patients had higher BALF  $\text{NO}_x^-$  than the healthy control group ( $p < 0.001$ ). Sepsis patients had higher plasma  $\text{NO}_x^-$  and  $\alpha\text{-TOH}$  than mechanically-ventilated patients without sepsis (all  $p < 0,05$ ). In the Sepsis patients, the ICU non-survivors had higher levels of BALF  $\text{NO}_x^-$  than ICU survivors 280(70 - 127)  $\mu\text{M}$  versus 31(15 - 47)  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ .

**Conclusions:** We conclude that during early phases of sepsis there is an enhanced lung nitroxidative stress due to an increase of  $\bullet\text{NO}$  production leading to secondary

•NO-derived oxidants, which promote protein nitration and lipid peroxidation. This is associated with ARDS /ALI and increased mortality in ICU.

### **PALABRAS CLAVE**

Sepsis, shock, injuria pulmonar, síndrome distress respiratorio agudo del adulto, ventilación mecánica, biomarcadores, óxido nítrico, nitrito, nitrato, nitrotirosina, malondialdehído,  $\alpha$ - tocoferol, lesión pulmonar aguda, lesión asociada a la ventilación mecánica, estrés oxidativo, estrés nitrooxidativo

### **KEY WORDS**

Sepsis, shock, ARDS, ALI, VILI, peroxynitrite, nitrate, nitrite, 3-nitrotirosina, oxidative stress, nitro oxidative stress, nitrooxidative stress,  $\alpha$ -tocopherol, mechanical ventilation,

# Tabla de Contenidos

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>19</b>
<b>II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....</b>	<b>25</b>
Sepsis.....	25
Lesión pulmonar y síndrome de distress respiratorio del adulto.....	27
Bioquímica y fisiología de las especies activas del oxígeno y de especies activas derivadas del nitrógeno.....	28
Defensas antioxidantes. ....	30
Peroxiredoxina.....	31
Definición de Estrés oxidativo.....	35
Especies oxidantes y daño pulmonar.....	42
Óxido Nítrico ( $\bullet$ NO) .....	43
Definición de Estrés nitroxidativo.....	44
Biomarcadores de lesión pulmonar en sepsis y ventilación mecánica.....	49
Rol del Óxido Nítrico en la sepsis y lesión pulmonar aguda.....	50
Daño nitroxidativo de proteínas de membrana basal y matriz extracelular.....	52
Nitración del surfactante pulmonar.....	55
<b>III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>58</b>
Hipótesis sobre el estrés nitroxidativo en sepsis e injuria pulmonar.....	58
Desarrollo del estudio.....	58
Objetivo general.....	59
Objetivos específicos. ....	59
<b>IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MATERIALES Y METODOS. ....</b>	<b>60</b>
Criterios de inclusión.....	61
Criterios de exclusión. ....	61
Selección de pacientes.....	62
Pacientes del grupo sepsis.....	64

Pacientes en ventilación mecánica sin sepsis.....	64
Grupo de control en block quirúrgico.....	65
Instrumentación. ....	65
Variables.....	65
Bioética.....	65
Protocolo de lavado bronquioloalveolar.....	66
Reactivos.....	67
Medida de Nitrito y nitrato.....	67
Medida de malondialdehído.....	69
Medición de 3-nitrotirosina unida a proteínas.....	75
Medida de $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) .....	77
Estadística.....	79
<b>V.RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
Pacientes.....	80
Grupo sepsis.....	80
Grupo ventilación mecánica.....	80
Variables clínicas descriptivas al ingreso en la Unidad de Cuidado Intensivo.....	81
3-nitrotirosina en líquido de lavado bronquioloalveolar.....	87
Malondialdehído en líquido de lavado bronquioloalveolar.....	87
Proteínas en LBA.....	89
Nitrito y nitrato en plasma.....	89
Malondialdehído en plasma.....	91
$\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) en plasma.....	92
Pronóstico.....	96
Análisis de sobrevida según $\text{NO}_x^-$ en LBA.....	96
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>100</b>
Estrés nitroxidativo pulmonar y producción de $\bullet\text{NO}$ pulmonar y sistémica.....	104

Concentración de proteínas y lesión pulmonar.....	105
Estrés nitrooxidativo y lesión pulmonar aguda.....	106
Uso de NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> en LBA como biomarcador pronóstico.....	107
Disminución de defensas antioxidantes (α-tocoferol) .....	108
Limitaciones.....	111
Aplicaciones.....	112
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>113</b>
<b>VIII. RESUMENES PRESENTADOS EN JORNADAS Y CONGRESOS.....</b>	<b>114</b>
<b>IX. ARTICULO COMPLETO.....</b>	<b>114</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>119</b>

## II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### Sepsis

Sepsis es uno de los cuadros clínicos paradigmáticos en medicina intensiva. Surge bruscamente, compromete múltiples órganos y sistemas distantes con referencia al foco de infección, pone en peligro la vida en forma inmediata, requiere cuidado continuo y sustitución artificial de funciones, y es potencialmente reversible. Su cuadro completo y más grave asociando foco de infección y disfunción múltiple de órganos se ha denominado por consenso sepsis severa [1]. La sepsis y la falla multiorgánica (FMO) son de las principales causas de muerte y morbilidad entre los pacientes admitidos a unidades de cuidado intensivo (UCI). La piedra angular de FMO es el desarrollo de una progresiva disfunción fisiológica en dos o más órganos o sistemas después de una amenaza aguda a la homeostasis sistémica. Los factores de riesgo son diversos e incluyen infección, condiciones inflamatorias no infecciosas, injuria traumática o quemaduras graves, isquemia, exposición a toxinas y activación inmunológica sistémica[2-5]. La mortalidad de este síndrome se correlaciona con el número de órganos en disfunción y con la severidad de disfunción de cada órgano en particular[3]. Globalmente la sepsis causa elevada mortalidad, morbilidad y consumo de costos[6]. Desde el punto de vista de los mecanismos de enfermedad Sepsis se define por la presencia de foco infeccioso y respuesta inflamatoria, actualmente este concepto comprende infección y disfunción orgánica con peligro de vida[7]. Anteriormente la presencia de disfunciones orgánicas se interpretaba como sepsis severa [8, 9]. Independientemente de la definición utilizada sepsis es un síndrome con elevada mortalidad por la presencia o eventual desarrollo de disfunción orgánica que compromete la vida [10, 11]. La sepsis y sus síndromes asociados aumentan la prevalencia e incidencia de morbilidad, mortalidad y costos de áreas críticas y en UCI[12]. Entre las repercusiones más frecuentes de la sepsis se ha reportado la lesión pulmonar aguda (LPA) y síndrome distress respiratorio del adulto (SDRA) [13]. La tasa de mortalidad por sepsis en hospitales y unidades de cuidados intensivos (UCI) se encuentra dentro del rango de 20 a 50%[14, 15]. El tratamiento de la sepsis y sus repercusiones orgánicas consiste en tratar el foco infeccioso con antibióticos o

cirugía, realizar el sostén de funciones vitales orgánicas en falla (hemodinámico, respiratoria, renal, neurológico, hematológico, hepático, metabólicas) y en evitar complicaciones[16].

La detección precoz de la sepsis y sus manifestaciones, tanto por medio de biomarcadores o por su presentación clínica también mejora el pronóstico de los pacientes con sepsis o en riesgo de sepsis [17, 18]. La disfunción respiratoria en sus diferentes grados de severidad está presente en la sepsis. Se ha reportado que la disfunción respiratoria de origen séptico es de peor pronóstico por la mayor expresión de mediadores de inflamación a nivel pulmonar[19].

Conceptos clave de la sepsis,

- La sepsis es la causa principal de muerte por infección, especialmente si no se reconoce y trata de inmediato. Su reconocimiento exige una atención urgente.
- La sepsis es un síndrome formado por factores patógenos y factores del huésped (por ejemplo, sexo, raza y otros determinantes genéticos, edad, comorbilidades, medio ambiente) con características que evolucionan con el tiempo. Lo que diferencia a la sepsis de la infección es una respuesta aberrante del huésped o desregulada y la presencia de disfunción orgánica.
- La disfunción orgánica inducida por sepsis puede ser oculta; por lo tanto, su presencia debe ser considerada en cualquier paciente con infección. Por el contrario, una infección no reconocida puede ser la causa de una disfunción orgánica de nueva aparición. Por lo tanto, cualquier disfunción orgánica inexplicable debería aumentar la posibilidad de una infección subyacente.
- El fenotipo clínico y biológico de la sepsis puede modificarse por enfermedades agudas preexistentes, comorbilidades de larga duración, medicamentos e intervenciones.
- Las infecciones específicas pueden provocar una disfunción del órgano local sin generar una respuesta sistémica desregulada del huésped.



## **Lesión pulmonar y síndrome de distress respiratorio del adulto**

En este contexto toma especial importancia el desarrollo de LPA/SDRA. En relación a su patogenia se destaca la presencia de mediadores y citoquinas, y la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) [20-22]. La lesión inicial estimula la respuesta inflamatoria provocando que un estímulo menor dispare una respuesta exagerada. En particular, el leucocito polimorfonuclear o neutrófilo (PMN) una célula equipada con capacidad de provocar daño oxidativo por vía de los sistemas nicotina adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) y óxido nítrico sintetasa (NOS), ha sido implicado como un pivot temprano de la FMO[23, 24]. Ante una situación de lesión, el PMN es activado por mecanismos infecciosos, tóxicos o inmunológicos con la capacidad de desencadenar una respuesta inflamatoria exagerada que lidere la FMO[25].

Si la lesión inicial es lo suficientemente grande se producirá una FMO temprana, con un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) severo. Si la lesión es moderada (SIRS moderado) y persistente podría desencadenarse FMO de manera tardía. En fase inicial de cebado de los PMN se implica al tubo digestivo y al modelo de isquemia reperfusión mesentérica. También está demostrada la isquemia de reperfusión a nivel pulmonar y el secuestro de PMN activados en el pulmón determinado LPA/SDRA o favoreciendo el desarrollo de infección localizada[3]

El SDRA del adulto es un proceso inflamatorio caracterizado por acumulación de neutrófilos, infiltrados pulmonares difusos y edema pulmonar asociado con hipoxemia. Se ha demostrado que el estrés oxidativo con liberación de ERO y enzimas lisosomales juega un rol importante en la patogénesis de la LPA/SDRA. Existe relación estrecha entre sepsis severa y SDRA, siendo la sepsis una de las causas más frecuentes del mismo. Sin embargo, no todo SDRA ocurre por sepsis de manera que puede haber diferencias entre SDRA por sepsis y SDRA por otras causas. Además, puede haber diferencias entre el modo en que la sepsis lesiona el pulmón y el modo como lesiona otros órganos. Estas diferencias podrían tener importancia en la aproximación terapéutica. SDRA se definió por la presencia de insuficiencia respiratoria aguda con una relación  $PO_2$  arterial sobre fracción inspirada de oxígeno (PAFI) menor de 200, presión capilar pulmonar enclavada (PCP) menor o igual de 18 mm Hg, e infiltrados bilaterales en la radiología de tórax. Injuria

pulmonar se define por la presencia de PAFI menor de 300 pero mayor de 200, PCP menor o igual de 18 mm Hg, e infiltrados bilaterales en la radiología de tórax [26-28]. Actualmente definimos SDRA de acuerdo al consenso de Berlín [29-31]. De acuerdo con esta definición son criterios para SDRA, factor de riesgo conocido o nuevo o empeoramiento de síntomas respiratorios, que ocurre dentro de 1 semana luego de la exposición al factor de riesgo; opacidades bilaterales en la radiografía de tórax que no se explican completamente por derrames, colapso lobular, colapso pulmonar o nódulos. Origen del edema y de la insuficiencia respiratoria no explicada completamente por insuficiencia cardíaca o sobrecarga de líquidos (para esto se necesita evaluación objetiva, por ejemplo ecocardiografía para excluir edema hidrostático si no hay factor de riesgo presente). A nivel de oxigenación se clasifica como leve cuando la relación  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$  está entre 200 mm Hg a 300 mm Hg con PEEP o CPAP 5 cm  $\text{H}_2\text{O}$ , moderado cuando la relación  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$  está entre 100 mm Hg y 200 mm Hg con PEEP 5 cm  $\text{H}_2\text{O}$ , y es severa cuando  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$  es menor de 100 mm Hg con PEEP 5 cm  $\text{H}_2\text{O}$ .

En el edema pulmonar de cualquier causa aumenta el agua extravascular pulmonar, la cuantificación de la misma junto a otras variables permite una más precisa definición y podría cuantificar la severidad de la injuria pulmonar[32]. De acuerdo a Schuster el criterio definitivo para diagnóstico de SDRA sería: edema alveolar difuso, aumento de permeabilidad vascular pulmonar, daño alveolar difuso. El criterio práctico para el mismo autor sería: infiltrados radiológicos bilaterales, aumento de la permeabilidad vascular, un entorno clínico apropiado o condición predisponente[28, 33].

## **Bioquímica y fisiología de las especies activas del oxígeno y de especies activas derivadas del nitrógeno**

Un radical libre (RL) es definido como una especie que contiene uno o más electrones no apareados. Estas moléculas tienen en general alta reactividad, y producen reacciones en cadena autoperpetuables [34]. La reducción monovalente del oxígeno en uno, dos o tres electrones da lugar a la formación de radicales libres o especies reactivas del oxígeno (ERO). Las especies activas del oxígeno conocidas

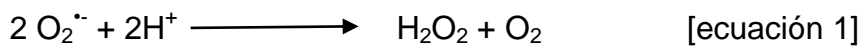
son respectivamente:  $O_2^{\bullet-}$ , peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ). Las ERO y en particular el  $\bullet OH$  pueden causar un importante daño sobre los lípidos de membrana por un proceso denominado lipoperoxidación[35, 36], así como pueden modificar proteínas y material genético. El daño oxidativo molecular se traduce como cambios de función biológicas conduciendo a alteraciones en la permeabilidad de membranas, pérdida de actividad enzimática y efectos mutagénicos, entre otros [37, 38].

Las especies activas de oxígeno pueden ser generadas de fuentes muy diversas que incluyen: respiración mitocondrial, metabolismo de las purinas, activación de neutrófilos, metabolismo del ácido araquidónico, oxidación de catecolaminas, participación de células endoteliales, reacciones con  $\bullet NO$ , oxidantes exógenos como humo de cigarrillo, hiperoxia, agentes quimioterápicos, etc. En el metabolismo de las purinas se destaca la producción de ERO en la reacción de la enzima xantino oxidasa, proceso que ha sido denominado el daño oxidativo por isquemia reperfusión (I/R) [37, 39]. Los neutrófilos son una fuente importante de producción de ERO. Esta producción se vincula con la presencia de la enzima NADPH que se encuentra en la membrana de los PMN. Cuando ésta enzima se activa, oxida el NADPH citoplasmático a  $NADP^+$  y reduce el oxígeno molecular a  $O_2^{\bullet-}$ . Esta producción juega normalmente un rol fisiológico en la acción bactericida de los PMN. El aumento de la producción de ERO por los PMN se conoce como "estallido respiratorio" y puede ocurrir en respuesta a distintos estímulos. Inicialmente se produce un proceso de migración y adhesión leucocitaria a los endotelios de la microcirculación afectada. Cualquiera que fuera el estímulo inicial, los PMN activados se adhieren firmemente al endotelio vascular para luego alcanzar el espacio intersticial. Por su agregación dentro de la luz vascular pueden ocluir la microcirculación, además, liberan importante cantidad de radicales libres, enzimas proteolíticas y peroxidasas responsables de destrucción tisular. Se ha postulado el rol protector del  $\bullet NO$  que en ciertas condiciones tiene la capacidad de inhibir la adhesión leucocitaria. Se ha demostrado secuestro de leucocitos en el pulmón luego de reperfusión intestinal o de los miembros inferiores, determinando edema pulmonar de tipo lesional.

## Defensas antioxidantes.

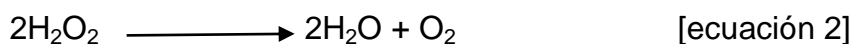
Los mecanismos de defensas antioxidantes pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos. Permiten neutralizar los efectos tóxicos de las especies activas de oxígeno: sustancias como el ácido ascórbico (vitaminas C), y  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOH, vitamina E), la albúmina, haptoglobina-hemopexina, ceruloplasmina, transferrina-lactoferrina, bilirrubina, ácido úrico y sulfidrilos (incluyendo glutatión) han mostrado poder antioxidante y forman parte de los mecanismos de defensa antioxidante no enzimáticos. Las enzimas antioxidantes incluyen la Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa y glutatión peroxidasa (GPx)[40-43]. La detoxificación de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) ocurre primariamente por reacciones de dismutación:

SOD



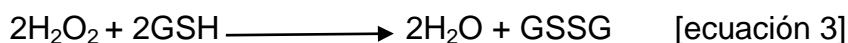
Esta reacción puede ocurrir de manera espontánea pero es catalizada por SOD. De esta forma se genera  $H_2O_2$  sustancia tóxica que puede ser metabolizada por Catalasa.

Catalasa



El  $H_2O_2$  puede ser detoxificado también por la GPx que lo utiliza para oxidar glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) [44-48]

GPx



El GSH se regenera por una enzima llamada glutatión reductasa que usa nicotinamina adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Es un hecho conocido que los sistemas biológicos que generan ERO contienen sistemas enzimáticos que permiten neutralizar la toxicidad de los mismos. La SOD lo neutraliza por dismutación y trabaja en conjunción con catalasa y GPx. En el plasma humano existen muy bajas concentraciones de SOD y GPx y por lo tanto no parece ser ésta, la principal fuente de defensa antioxidante endotelial. La mayor parte de la defensa antioxidante extracelular se lleva a cabo por el secuestro de los metales de transición en moléculas como la transferrina, la acción antioxidante del grupo tiol de la albumina, la acción de ácido ascórbico y  $\alpha$ -TOH. Cuando las defensas antioxidantes son superadas, las ERO quedan en libertad de reaccionar con cualquiera de las moléculas blanco intracelulares o extracelulares promoviendo el daño oxidativo[49].

## **Peroxiredoxina**

Los peróxidos son considerados como productos metabólicos que juegan papeles celulares fisiológicos esenciales. Los organismos han desarrollado mecanismos eficientes para metabolizar los peróxidos, principalmente basado en dos tipos de química redox, catalasas peroxidasas que dependen del grupo protésico hemo para permitir la reducción de peróxido y las peroxidasas basadas en tioles que apoyan sus actividades redox en residuos cisteína/ selenocisteína de reacción rápida (Cys/Sec). Entre el último grupo, glutatión peroxidasas (GPx) y peroxiredoxinas (Prxs) son las familias más extendidas y abundantes. Mecanismo de catálisis. La mayoría de las peroxiredoxinas usan el sistema Trx como reductor fisiológico. Entonces, la reacción general catalizada por Prxs puede describirse como

### Peroxiredoxina



### Tioredoxina reductasa



donde el Trx oxidado ( $\text{Trx}_{\text{ox}}$ ) se puede restaurar al reducido forma ( $\text{Trx}_{\text{red}}$ ) por Trx reductasa usando NADPH como fuente de electrón

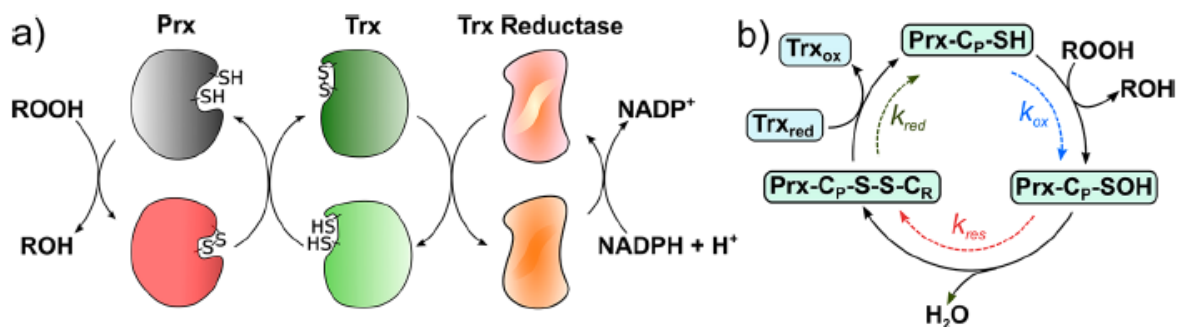


Figura 1. Ciclo catalítico de Prxs. (a) Descripción completa del flujo de electrones durante la reducción de hidropéroxido catalizada por Prx. No todos los Prx se basan en el sistema Trx/Trx reductasa/NADPH. (b) Ciclo catalítico: oxidación, reacción de CP con hidropéroxidos, produciendo el ácido sulfénico; resolución, formación de disulfuro entre CP y CR reducción por Trx para completar el ciclo. Tomado de Zeida y cols.[50]

Las mitocondrias son sitios principales de formación de  $\text{ONOO}^-$ . El sistema de peroxiredoxinas participa en la reducción de  $\text{ONOO}^-$  en la mitocondria. Mientras que a bajas concentraciones de  $\text{ONOO}^-$  mitocondrial se ha asociado con acciones de señalización redox, aumento de los niveles pueden alterar la homeostasis mitocondrial y generar patologías. La Peroxiredoxina-3 (Prx-3) está ubicada exclusivamente en las mitocondrias, donde se ha demostrado previamente que juega un papel importante papel en la reducción de peróxido de hidrógeno. A su vez, la reducción de  $\text{ONOO}^-$  por Prx-3 se ha inferido de sus acciones protectoras contra

la nitración de la tirosina y contra la neurotoxicidad en modelos animales [51-53]. La Prx-3 humana reduce el  $\text{ONOO}^-$  con una tasa constante de  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.8 y  $25^\circ\text{C}$ . A nivel experimental la reacción con hidroperóxidos causa cambios bifásicos en la fluorescencia de Prx-3: la primera fase corresponde a la oxidación peroxidativa de cisteína a ácido sulfénico. El  $\text{ONOO}^-$  en exceso conduce a la hiperoxidación de Prx-3 y nitración de tirosina, generando modificaciones oxidativas postraduccionales. Se espera que una fracción significativa del oxidante reaccione con  $\text{CO}_2$  y genere radicales secundarios, que participan en otras reacciones de oxidación y nitración, particularmente en condiciones metabólicas de descarboxilaciones oxidativas activas o aumento formación de hidroperóxido. Por tanto la Prx-3 como la peroxiredoxina-5 debe ser considerados como objetivos principales del  $\text{ONOO}^-$  en la mitocondria[54].

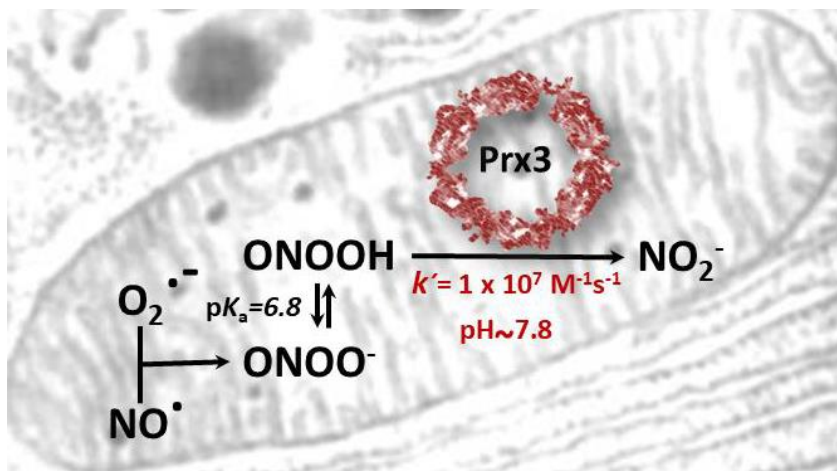


Figura 2. Reducción de  $\text{ONOO}^-$  por peroxiredoxina-3. Tomado de De Armas y cols. [54].

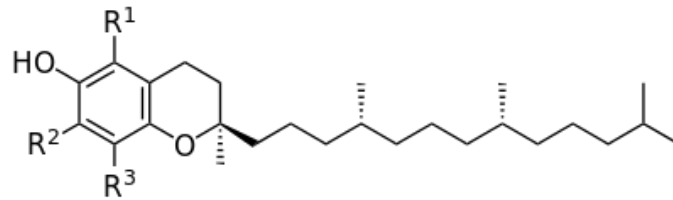
### **$\alpha$ -tocoferol**

A los sistemas antioxidantes de naturaleza enzimática (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasas), se agregan defensas antioxidantes no enzimáticas. La mayoría de los antioxidantes no enzimáticos se basan en principios de reacciones redox y están localizados en medios acuosos (vitamina C, glutatión) o lipídicos (vitamina E, ubiquinol, carotenoides y flavonoides). La vitamina E pertenece a la familia de compuestos poliprenoides. En estado natural tiene ocho diferentes formas de isómeros: cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Todos ellos tienen un anillo

aromático, llamado cromano, con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide saturada. Si dicha cadena es saturada, los isómeros son tocoferoles, y si es insaturada, son tocotrienoles. Existen formas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  para ambos isómeros, esto se determina por el número de grupos metílicos en el anillo aromático. Cada una de las formas tiene su propia actividad biológica.

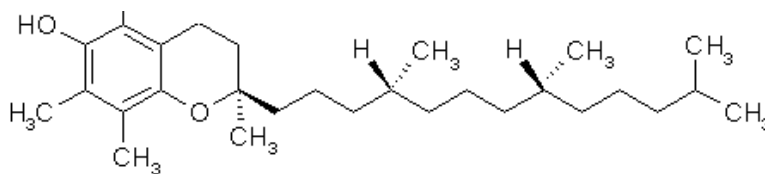
El  $\alpha$ -TOH, componente principal de la vitamina E, constituye el principal antioxidante liposoluble capaz de interrumpir la oxidación de lípidos insaturados a nivel de membranas biológicas y lipoproteínas. Cuando un radical lipídico del tipo alcoxilo (LO) o peroxilo (LOO) generado por procesos de lipoperoxidación reacciona con  $\alpha$ -TOH, es reducido a hidroperóxido lipídico (LOOH), incapaz de seguir reacciones de propagación de la lipoperoxidación. De esta forma el  $\alpha$ -TOH al donar un electrón y oxidarse como consecuencia de neutralizar radicales lipídicos, se transforma en radical tocoferoxilo, que puede ser reconvertido a su estado nativo tocoferol por otros antioxidantes. La vitamina C o ácido ascórbico (ascorbato) es el reductor más importante de  $\alpha$ -TOH, con la formación de un radical de la vitamina C (ascorbilo) que, a su vez, puede ser reducido nuevamente a ascorbato por otros reductores como glutatión y tioles. La acción combinada de las vitaminas E y C resulta en un sinergismo antioxidante debido a su localización en distintos compartimientos (fase liposoluble e hidrosoluble, respectivamente).





Esquema general de la molécula de tocoferol

R1	R2	R3	
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	α-tocoferol
CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	β-tocoferol
H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	γ-tocoferol
H	H	CH <sub>3</sub>	δ-tocoferol



α- tocoferol

Figura 3. Estructura química de la vitamina E y α- tocoferol

### Definición de Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes en favor de los oxidantes, lo que conduce a una interrupción de la señalización y control redox y/o daño molecular [55]. La investigación sobre los mecanismos redox moleculares que rigen las respuestas al estrés oxidativo está en pleno desarrollo. En el lado más práctico, se recomienda el uso cauteloso de la terminología y los métodos relacionados con las llamadas ERO, especies reactivas de oxígeno. El papel principal en las defensas antioxidantes lo cumplen las enzimas antioxidantes, no los compuestos antioxidantes integrados por moléculas de bajo peso molecular.

La producción de estrés oxidativo y nitroxativo genera modificaciones en biomoléculas que son blancos de estos procesos, entre ellas mencionamos proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y glucoproteínas. Estas modificaciones generan alteraciones estructurales de diversa entidad y alteraciones estructurales que sirven de huella como evidencia de la producción de estrés oxidativo y nitroxativo. Entre

estas huellas se mencionan la nitración generando proteínas nitradas en sitios o residuos específicos. A nivel del metabolismo lipídico este proceso se denomina lipoperoxidación, entre las moléculas que se generan por modificaciones en las moléculas de lípidos se ha reportado el malondialdehído (MDA)

El campo de la investigación del estrés oxidativo abarca la química, la bioquímica, la biología celular, la fisiología y la fisiopatología, la investigación de la salud y las enfermedades relacionadas, y en última instancia proporciona una base científica para una moderna medicina redox[56-58].

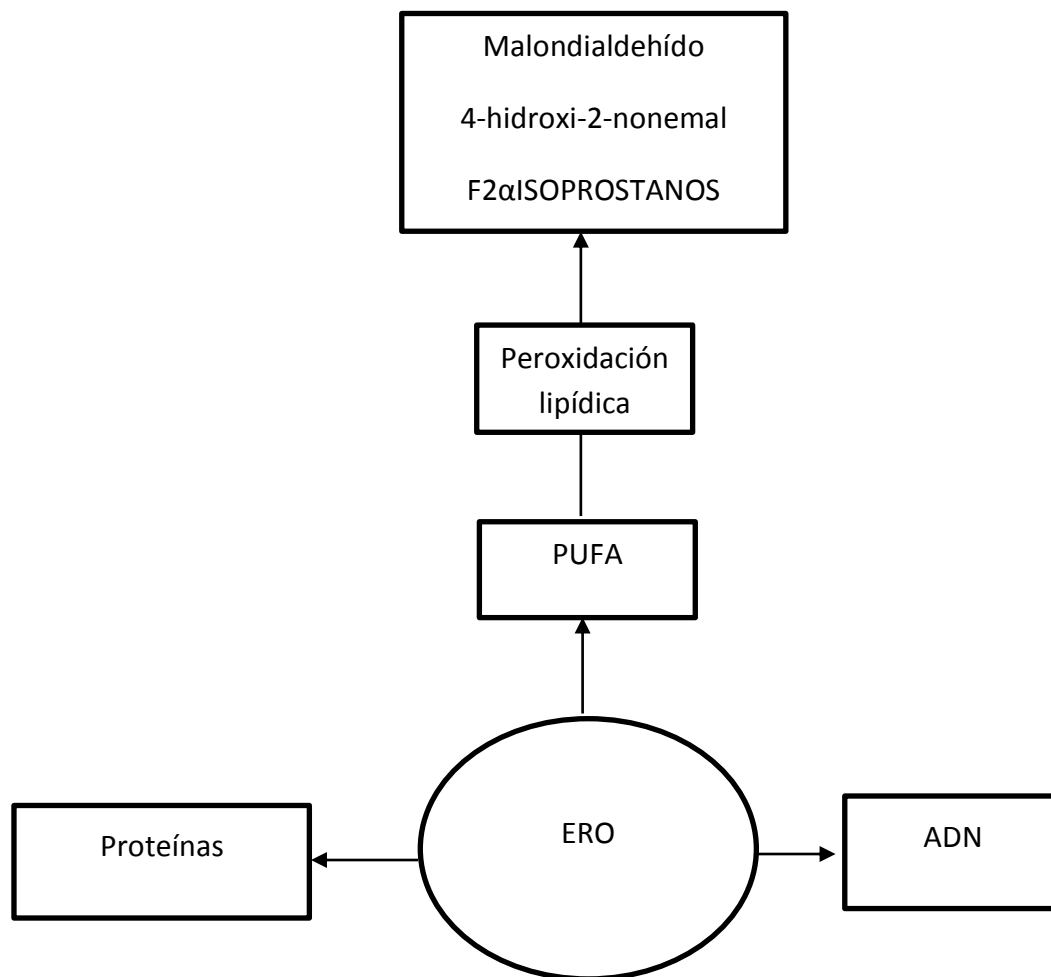


Figura 4. Esquema simplificado que ilustra el ataque de especies activas de oxígeno (ERO) sobre proteínas, ADN y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, polinunsaturated fatty acid), siendo estos últimos representantes de la clase de biomoléculas lipídicas. ERO peroxidiza PUFA para generar finalmente malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-2-nonemal (HNE). El PUFA eicosanoide-ácido araquidónico- se peroxidiza por ERO para formar isoprostanos F2, tales como 15(S)8-isoprostaglandina F2 $\alpha$  además de MDA y HNE. La peroxidación lipídica puede ser enzimática. La segmentación de PUFA con formación de hidroxialdehído y luego hidroperóxidos conduce a la formación de MDA, mecanismo propuesto por Esterbauer (1991[59, 60]), y revisado por Tsikas (2017, [61]). La síntesis de prostaglandinas generan endoperóxidos bicíclicos que generan MDA, mecanismo propuesto por Pryor (1975, [62, 63]), Frankel y Neff (1983[64, 65]). MDA se forma por acción enzimática en la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub>.

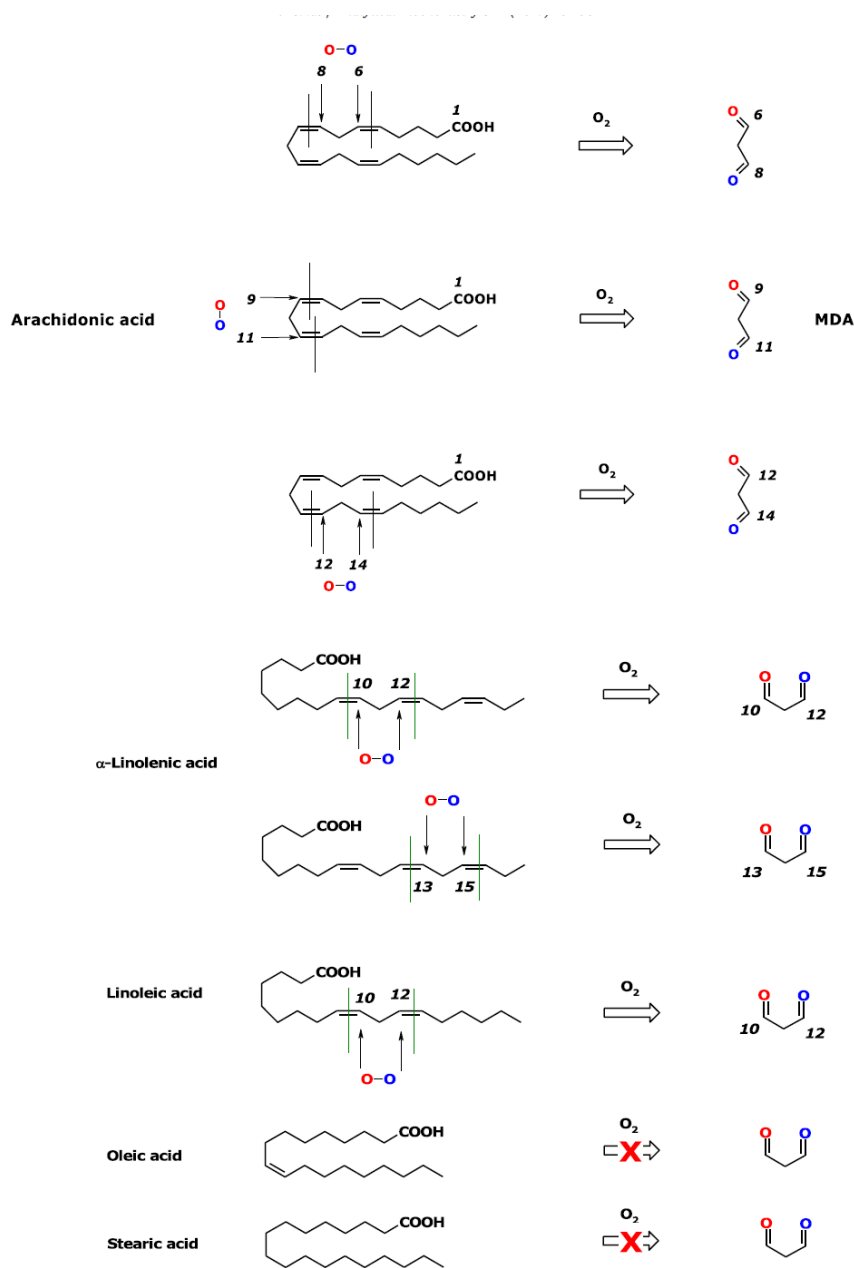


Figura 5. Requisitos para la formación de malondialdehído a partir de ácidos grasos por endoperoxidación. El MDA se forma a partir de la endoperoxidación de ácidos grasos insaturados de los cuales los dobles enlaces están separados por un grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ). El número de posibles moléculas de MDA corresponde al número de tales grupos metileno. El ácido oleico monoinsaturado y el ácido esteárico saturado no se pueden peroxidizar para formar MDA. Según este mecanismo, la endoperoxidación del ácido eicosapentaenoico (EPA) podría proporcionar cuatro moléculas de MDA producidas en diferentes posiciones de la molécula[66].

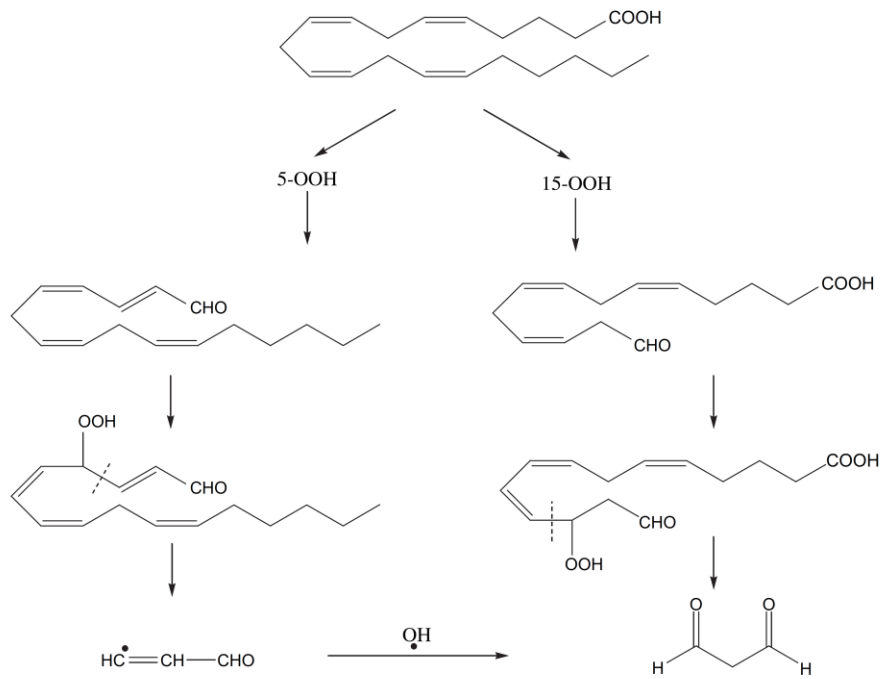


Figura 6. Los dos mecanismos propuestos por Esterbauer y colegas basados en la formación de hidroperóxido y escisión de la cadena de ácido graso para dar un hidroperoxialdehído; MDA es luego generado por escisión o por reacción del radical acroleína con un radical hidroxilo. [67]

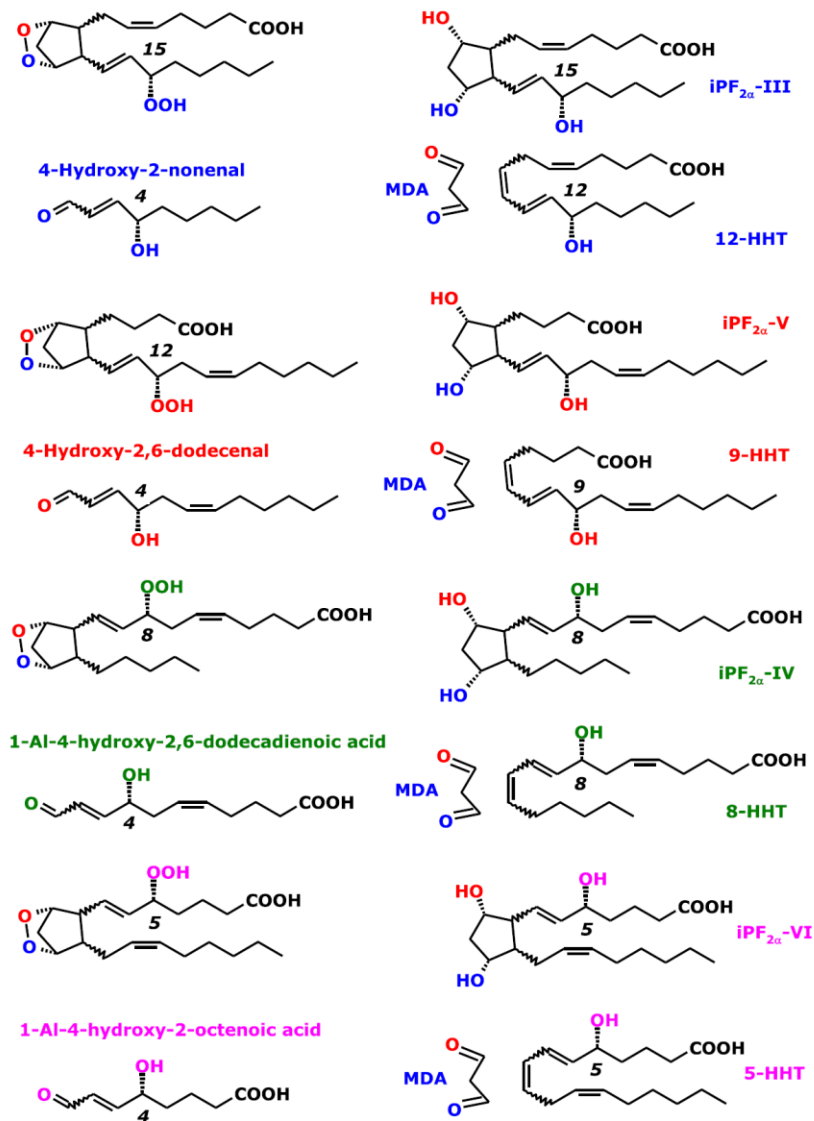


Figura 7. Esquema simplificado que propone la formación de MDA, los cuatro tipos de isoprostanos F2, los cuatro ácidos isómeros hidrox-heptadecatrienoicos, 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y los aldehídos correspondientes de los endoperoxidos del ácido araquidónico[66].

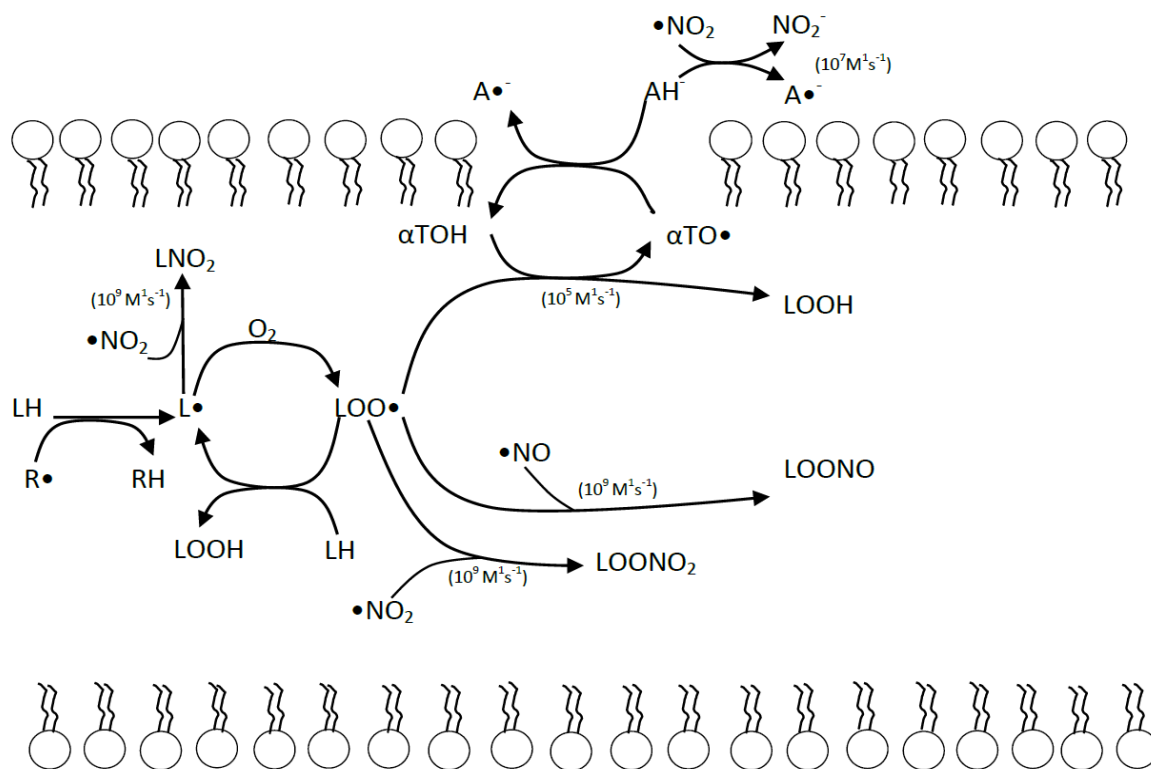


Figura 8. Mecanismo de lipoperoxidación y acción antioxidante de las vitamina C, E y del  $\bullet\text{NO}$  en medio lipídico. Asc, ácido ascórbico; Asc $\bullet$ , radical ascorbilo; LH, ácido graso; L $\bullet$ , radical lipídico; LOOH, hidroperóxido lipídico; LOONO, LOO, radical peróxido;  $\bullet\text{NO}$ , XH, reductor; X $\bullet$ , radical. Entre parentésis se muestran las velocidades de reacción en moles por segundo. La protección con  $\bullet\text{NO}$  fue más eficiente para  $\alpha\text{-TOH}$  en LDL que para ascorbato en solución, evidenciando la reacción cinéticamente altamente favorecida de los radicales peróxido lipídicos con  $\bullet\text{NO}$  que con  $\alpha\text{-TOH}$  según lo evaluado por simulaciones asistidas por computadora. Además, el  $\text{CO}_2$  (1.2 mM) inhibió tanto la  $\alpha\text{-TOH}$  como la oxidación de lípidos. Estos resultados demuestran que  $\text{ONOO}^-$  induce la oxidación de  $\alpha\text{-TOH}$  en LDL a través de un mecanismo de radicales libres de un electrón; así, las acciones inhibitoras de  $\bullet\text{NO}$  y ascorbato pueden determinar una baja acumulación de  $\alpha\text{-tocoferil quinona}$  en los tejidos a pesar del aumento de la generación de  $\text{ONOO}^-$ . Diagrama basado en Rubbo y cols (Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives ,1994[68]) y Botti y cols ( Peroxynitrite-mediated  $\alpha\text{-tocoferol}$  oxidation in low-density lipoprotein: a mechanistic approach, 2004[69])

## Especies oxidantes y daño pulmonar

Las ERO incluyendo  $O_2^{\cdot-}$  y peróxido de hidrogeno son producidas de manera endógena en respuesta a citoquinas, factores de crecimiento, receptores acoplados con proteínas G, y estrés de cizallamiento en células endoteliales. Las ERO actúan como moléculas de señalización para mediar varias respuestas biológicas tales como expresión genómica, proliferación celular, migración celular, angiogénesis, apoptosis y envejecimiento en células endoteliales. La traducción de señales activadas por ERO, señalización oxidante, ha recibido intensa investigación. El exceso de producción de ERO contribuye en varios procesos fisiopatológicos, incluyendo disfunción endotelial, aterosclerosis, hipertensión, diabetes, SDRA, sepsis. La mayor fuente de ERO en células endoteliales es la NADPH oxidasa[70]. Existe amplia evidencia sobre la participación de ERO u oxidantes con un rol importante en la patogenia de SDRA[71]

Tanto estudios en lavado bronquioloalveolar (LBA) como histológicos han demostrado la presencia de neutrófilos en pulmón, estas células una vez activadas pueden liberar ERO y  $\cdot NO$  que pueden causar injuria pulmonar[72]. Entre estas especies formadas se destacan:  $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $ONOO^-$  y peroxinitroso ( $ONOOH$ ) [73, 74]. Por otra parte, el glutatión es un agente antioxidante endógeno normalmente presente en el LBA, en pacientes con SDRA el glutatión se encuentra disminuido en su forma reducida (GSH) y aumentada su forma oxidada. En el estudio de Bunnell y Pacht se comparó la cantidad de glutatión oxidado en pacientes con SDRA en relación a pacientes con edema cardiogénico. Se encontró glutatión oxidado elevado en pacientes con edema cardiogénico en relación a los controles normales no fumadores[75, 76]. El resultado del daño por estrés oxidativo en pacientes con SDRA fue determinado por dosificación de mieloperoxidasa en pacientes y por la presencia de antiproteasa alfa-1-oxidada en LBA y  $H_2O_2$  en el gas espirado[77-80]

La lesión pulmonar en el LPA/SDRA se ha asociado con un aumento en las concentraciones de  $H_2O_2$  espirado. Además, se informó que los pacientes con sepsis y SDRA tienen una mayor eliminación de  $H_2O_2$  en el suero que los pacientes con



SDRA solamente, pacientes con SDRA y sepsis tuvieron mayores concentraciones de  $H_2O_2$  urinario y mayor mortalidad[81, 82]. En pacientes con SDRA comparados con controles se encontró disminución de colesterol, ascorbato, ubiquinol en plasma. Esta disminución de colesterol indicando una disminución de la actividad de la lecitin colesterol acil transferasa, se acompañó de aumento de lipoperoxidos en líquido de edema pulmonar[83]. El poder antioxidante fue determinado en pacientes con sepsis desde las 16 horas de inicio del cuadro y luego diariamente hasta el día 10. Se encontró que el potencial antioxidante es inicialmente bajo en pacientes con sepsis permaneciendo bajo durante toda la evolución. Se relaciona con el desarrollo de FMO y con la evolución no favorable de estos pacientes[45, 84]. En pacientes con SDRA se ha reportado disminución de la actividad antioxidante en pulmón y disminución de antioxidantes sistémicos en sangre periférica[85-89]. La actividad oxidante alveolar en SDRA se ha vinculado a la activación inflamatoria (interleuquina-8, factor de necrosis tumoral, interleuquina-1) y aumento de vías procoagulantes [90-92]. El edema alveolar con alto contenido proteico es aumentado por la disminución de la actividad de urokinasa alveolar y la disminución del inhibidor de la actividad elastasa alveolar en pacientes con SDRA, lo que aumenta la actividad antifibrinolítico, y con el aumento de inhibidores de urokinasa, antiplasmina en LBA [93-95].

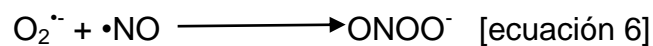
### **Óxido Nítrico ( $\bullet NO$ )**

El factor relajante derivado del endotelio (EDRF) con efectos de vasorelajación endotelial fue descrito en 1980 por Furchgott y Zawadzki, en 1987 Ignarro, Palmer, y Moncada separadamente señalan que el factor vasodilatador derivado del endotelio (Endothelial-Derived Relaxing Factor, EDRF) es el óxido nítrico[96-100]. Posteriormente en 1988 se descubre que el endotelio vascular es capaz de sintetizar  $\bullet NO$  partir de-L-arginina [98, 99].

El  $\bullet NO$  es un radical neutro, lipofílico, reactivo con el oxígeno y con una vida media biológica entre 5 y 30 segundos. Se ha demostrado su rol en sepsis, shock séptico, inflamación y SDRA. El  $\bullet NO$  tiene efecto antioxidante cuando su velocidad de producción es significativamente mayor que la generación de  $O_2^{\cdot -}$ . Las propiedades fisiológicas y antioxidantes del  $\bullet NO$  a nivel vascular se deben a, 1)

activación de la guanilato ciclasa que sintetiza GMPc produciendo vasodilatación; e inhibición de la agregación plaquetaria, 2) inhibición de la función celular inflamatoria, 3) unión a metales de transición y, 4) terminación de reacciones en cadena de tipo radicalar . Sin embargo, el •NO puede también tener acciones oxidantes que derivan de la producción de otras especies reactivas del nitrógeno.

En particular se destaca la formación de ONOO<sup>-</sup> cuando reacciona con O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. El ONOO<sup>-</sup> puede atravesar las membranas celulares y es una 2000 veces más potente que el peróxido de hidrógeno en oxidar los tioles celulares, cataliza la lipoperoxidación, oxida el ADN y conduce a nitración de tirosina [101-104].



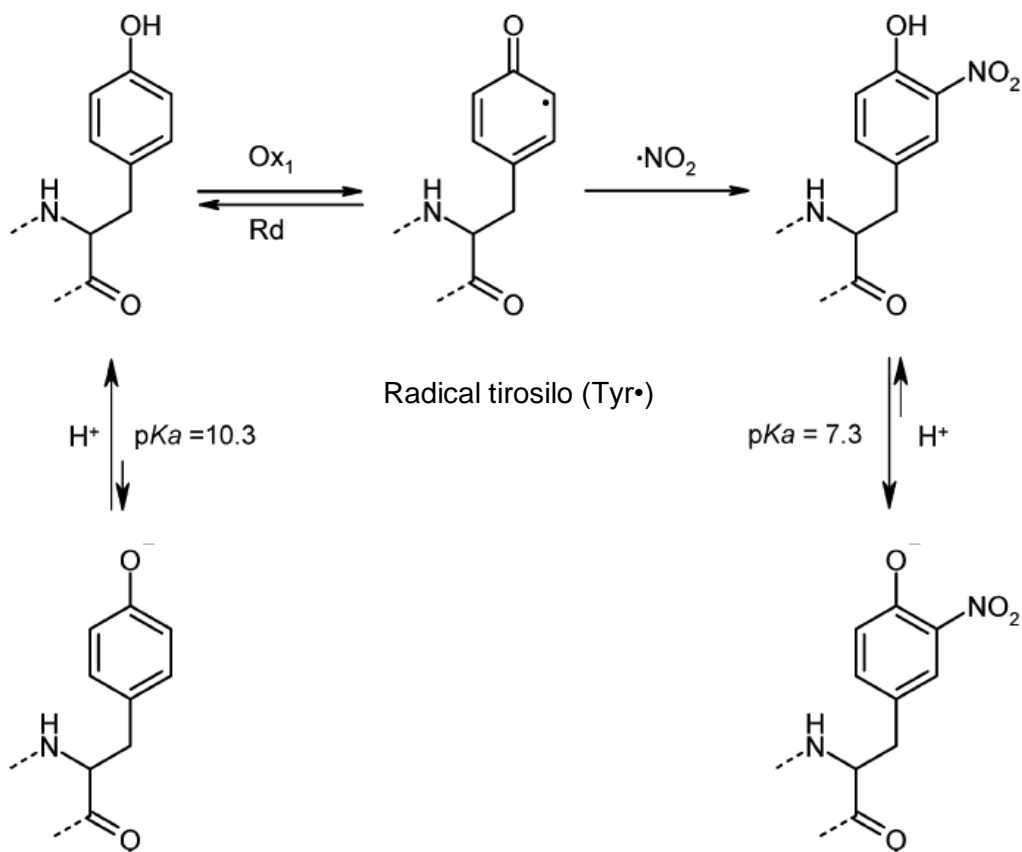
Esta reacción es aún más rápida que la dismutación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por SOD[105]. Los macrófagos alveolares, los PMN y las células endoteliales producen •NO el cual es convertido en ONOO<sup>-</sup> al reaccionar con O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. La reactividad de ONOO<sup>-</sup> es atribuida a su ataque directo a biomoléculas, su reacción con CO<sub>2</sub> para dar radical carbonato (CO<sub>3</sub><sup>•-</sup>) y la formación de •OH. Las reacciones de ONOO<sup>-</sup> oxidan tioles, ascorbato, hemoproteínas y metales de transición, mientras que eventos radicalares dan cuenta de la nitración de tirosina a 3-nitrotirosina (3-NT). El daño por ONOO<sup>-</sup> a nivel de órganos has sido implicado en reacciones por inmunocomplejos en edema pulmonar, isquemia reperusión del corazón, isquemia reperusión pulmonar, injuria pulmonar aguda, aterogénesis, y neurotoxicidad.

### **Definición de Estrés nitroxidativo**

El •NO en un radical libre relativamente estable que es generado por mecanismos biológicos que participa en una serie de procesos de traducción de señales fisiológicas en biología humana. Se han reportado fuentes de •NO enzimáticas y no enzimáticas. En circunstancias donde el •NO es producido en grandes cantidades y o en el contexto de un ambiente de prooxidantes, puede transformarse en una molécula tóxica y convertirse en un mediador patogénico de enfermedades humanas. En particular, la reacción controlada por difusión con el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> conduce a la formación de ONOO<sup>-</sup>, un poderoso oxidante y nucleofílico que provoca

la mayoría de la toxicidad asociada con  $\bullet\text{NO}$ . El  $\text{ONOO}^-$  promueve las reacciones de oxidación y nitración de uno y dos electrones a través de una serie de mecanismos, varios de los cuales involucran intermediarios de radicales libres.

Como fue mencionado el  $\bullet\text{NO}$  formado en condiciones fisiológicas no es un agente tóxico, pero el exceso de  $\bullet\text{NO}$  y los oxidantes derivados de  $\bullet\text{NO}$  pueden ejercer efectos biológicos dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición a estas especies, y la capacidad de las células para enfrentar el desafío de nitroxidación. El daño inducido por radicales libres y oxidantes se ha estudiado en profundidad porque se ha asociado a patologías humanas frecuentes [106]. Además, varias de las patologías humanas más prevalentes en la actualidad se han asociado a un aumento en la formación de radicales libres y la inducción de daño oxidativo celular. De hecho, las especies reactivas del nitrógeno (ERN),  $\bullet\text{NO}$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\bullet\text{NO}_2$  se han relacionado con el desarrollo de enfermedades neoplásicas cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatorias, metabólicas y malignas en un proceso globalmente definido como daño nitroxidativo[107]



Tirosina

3-nitrotirosina

Figura 9. Mecanismo de nitración de tirosina. La oxidación por un electrón de la tirosina produce radical tirosilo (Tyr•), que al reaccionar con  $\cdot\text{NO}_2$  evoluciona a 3-NT. Se debe tener en cuenta, que mientras que el grupo fenólico OH en la tirosina libre se protona casi al 100% a pH fisiológico, la nitración provoca una caída de 3 unidades de pH en el valor de pKa que resulta en una fracción significativa (aprox. 50%) del fenolato correspondiente. Tyr• se puede reducir de nuevo a tirosina por reductores (Rd) en competencia con la reacción de nitración.

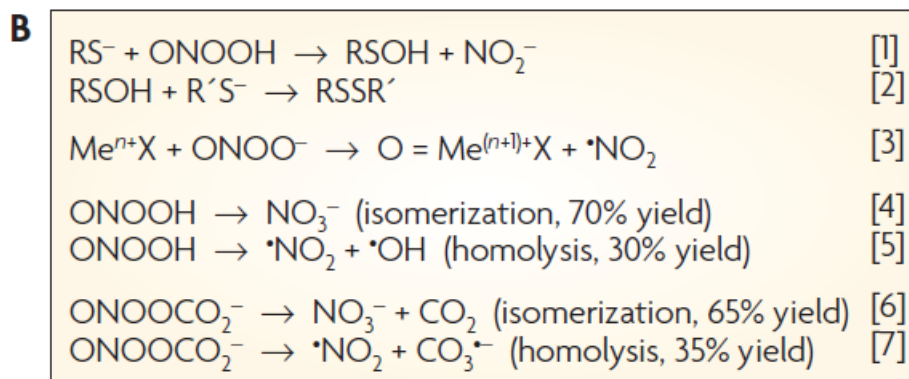
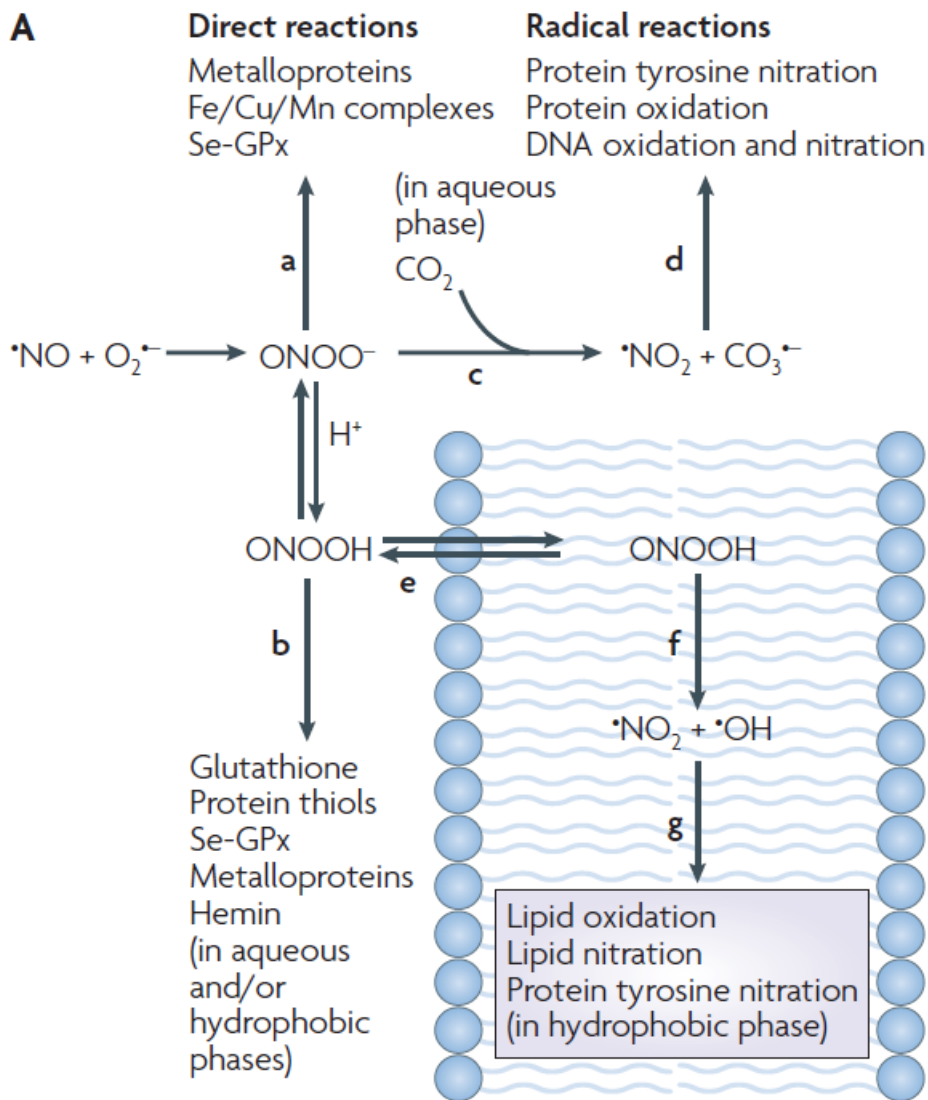


Figura 10. A. Bioquímica del  $\text{ONOO}^-$ : reacción objetivos y destino. B. Reacciones de descomposición del  $\text{ONOOH}$ . Tomado de Szabo C, Ischiropoulos H y Radi R[108]. A. El anión  $\text{ONOO}^-$  está en equilibrio con ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ;  $\text{pK}_a = 6.8$ ) y cualquiera puede sufrir reacciones directas con biomoléculas como se indica (a y b).

Una reacción fundamental de  $\text{ONOO}^-$  en sistemas biológicos es su rápida reacción con dióxido de carbono (en equilibrio con niveles fisiológicos de anión bicarbonato; c), que lleva a la formación de carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) y radicales de dióxido de nitrógeno ( $\bullet\text{NO}_2$ ) (rendimiento aproximado del 35%), que son buenos oxidantes de un electrón (d) que pueden fácilmente oxidar los aminoácidos como la cisteína y la tirosina para producir los radicales cisteinilo y tirosilo. Además,  $\bullet\text{NO}_2$  presenta control de difusión. Reacciones de terminación con radicales derivados de biomoléculas, dando como resultado compuestos nitrados (d). Alternativamente,  $\text{ONOOH}$  puede sufrir fisión homolítica para generar oxidantes de un electrón como  $\bullet\text{OH}$  y radicales  $\bullet\text{NO}_2$  (con un rendimiento del 30%; e). Sin embargo, esta reacción es lenta en sistemas biológicos en comparación con las otras reacciones de  $\text{ONOO}^-$  y  $\text{ONOOH}$  y por lo tanto es un modesto componente de la reactividad in vivo de  $\text{ONOO}^-$  en compartimentos acuosos. Sin embargo,  $\text{ONOOH}$  fácilmente cruza las bicapas lipídicas (f) y su descomposición a  $\bullet\text{OH}$  y los radicales  $\bullet\text{NO}_2$  parecen volverse relevantes en fases hidrofóbicas para iniciar la peroxidación lipídica y procesos de nitración de lípidos y proteínas (g). Además,  $\text{ONOOH}$  en las membranas puede sufrir reacciones directas con centros metálicos como hemina o tioles asociados a membranas. B. Caminos en la descomposición de  $\text{ONOO}^-$ . Se-GPx, glutatión peroxidasa que contiene selenio.

En la mayoría de los modelos experimentales la inhibición farmacológica de NOS y/o la adición de SOD o scavengers de radicales libres resulta en una significativa protección del proceso de lesión, y de la detección de 3-NT (huella de la reacción de  $\text{ONOO}^-$  contra compuestos tisulares) apoyando el rol patogénico de  $\text{ONOO}^-$  [109, 110]. Las ERO y ERN liberadas en el pulmón durante la LPA/SDRA son quimiotácticos para PMN. La destrucción de la matriz permite a los neutrófilos y sus productos penetrar en los alvéolos y causar daño parenquimatoso y muerte celular. Esto a su vez conduce al aumento de la permeabilidad con pérdida de la permeabilidad selectiva tanto del endotelio como del epitelio[111].

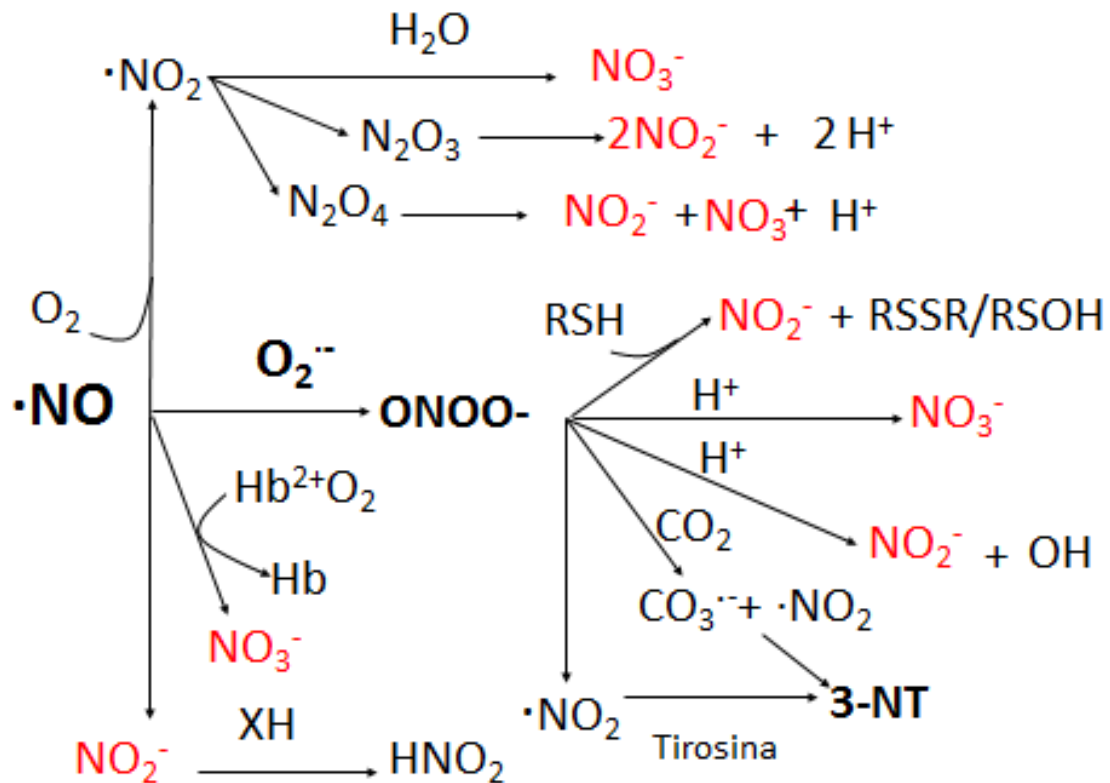


Figura 11. Mecanismos propuestos de generación de especies activas del nitrógeno y nitroxidantes derivados. Modificado de Calcerrada y cols[112].

Cuando el LPA/SDRA se presentan como entidades aisladas, en este caso la falla respiratoria es relevante y determina el pronóstico vital. Por otro lado LPA/SDRA pueden acontecer en el contexto de falla multiorgánica severa de patologías variadas. Como ejemplos podemos citar: sepsis, shock séptico, shock prolongado, pancreatitis, isquemia reperfusión de miembros, postoperatorio por aneurisma de aorta abdominal, pacientes politraumatizados con o sin traumatismo grave de tórax [113-120].

### Biomarcadores de lesión pulmonar en sepsis y ventilación mecánica

Para caracterizar el SDRA en cuanto a su evolución y diagnóstico se postulan diferentes marcadores. Estos marcadores van desde elementos clínicos, gasométricos, mecánica pulmonar, índices de permeabilidad y patrones de liberación de citoquinas. En los últimos años se ha puesto énfasis en buscar

marcadores biológicos de injuria pulmonar aguda que describan o complementen la descripción clínica, fisiológica y anatómica del SDRA. Hasta ahora solo hay estudios descriptivos en poblaciones muy heterogéneas de pacientes con SDRA. El conocimiento del fisiología y bioquímica de los biomarcadores de stress oxidativo y antioxidantes en pacientes sería un aporte más en el contexto de esta devastadora entidad que es el SDRA y la FMO [121].

La participación de radicales libres en la génesis y mantenimiento del daño celular en estas entidades ha sido demostrada, el  $\bullet\text{NO}$  y sus derivados tóxicos tienen participación relevante en la disfunción vascular sistémica y pulmonar, en la falla respiratoria contribuyendo al daño epitelial pulmonar y en la disfunción celular a nivel del metabolismo energético. En forma conjunta el descenso de moléculas antioxidantes en diferentes tejidos ha sido reportada en sepsis, trauma, shock séptico, SDRA [35, 44, 45, 49, 73, 122-125]. La fuente más importante de ERO en sepsis es el estallido respiratorio, pero hay una gran variedad de otras fuentes de RL. Entre ellas se señala, el uso de oxígeno suplementario, metabolismo de fármacos, isquemia reperusión, y más actualmente conocido es su rol en la lesión provocada por la ventilación mecánica [126, 127]. A nivel pulmonar existe un vasto conocimiento del de los RL y  $\bullet\text{NO}$  en los mecanismos fisiológicos de lesión, su potencial participación en el diagnóstico de disfunción, y del impacto sobre el metabolismo de RL y  $\bullet\text{NO}$  del sostén respiratorio en el desarrollo de complicaciones y pronóstico de los pacientes con sepsis e SDRA/LPA [128, 129].

### **Rol del Óxido Nítrico en la sepsis y lesión pulmonar aguda**

La ventilación mecánica y la presión positiva inducen alteraciones en la estructura pulmonar [130, 131]. Incluso en pulmones normales el biotrauma generado por el volumen corriente y la presión positiva durante la ventilación mecánica produce liberación de biomedidores[132-136]. La afectación pulmonar durante la sepsis se caracteriza por una respuesta inflamatoria acompañada de edema, infiltración celular e hipertensión pulmonar [20] [20, 137]. Las citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa, interferón gamma, interleuquinas y lipopolisacáridos activan las células inmunitarias para la producción de especies reactivas de oxígeno, principalmente  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , que a su vez actúa como un



precursor de oxidantes aún más poderosos como el peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo [138-143]. Además, existe una sobreproducción sistémica de  $\bullet\text{NO}$ , principalmente derivada de la NOS inducible durante la sepsis, que conduce a vasodilatación periférica patológica y lesión sistémica tisular [144-151] [152-157]. Se ha encontrado producción de  $\bullet\text{NO}$  y sus metabolitos en el pulmón durante sepsis experimental [158]. La unión de la producción de ERO y ERN con hiperproducción de  $\bullet\text{NO}$  desencadenan procesos que como resultado determinan estrés nitroxidativo [103, 104, 159-162].

El  $\bullet\text{NO}$  ha sido implicado en la etiología de numerosas enfermedades que involucran producción de ERO y ERN [145, 163-165]. En ese sentido,  $\bullet\text{NO}$  es visto solamente como patogénico; sin embargo, considerando la bioquímica de  $\bullet\text{NO}$  este puede también ser un factor protector significativo en disminuir la lesión mediada tanto por EAN o por ERO al reaccionar con moléculas prooxidantes como  $\text{O}_2^-$  [102, 165-168].

La lesión pulmonar inducida por mediadores inflamatorios y celulares, así como por biotrauma, es un problema relevante durante la sepsis o en pacientes con riesgo de desarrollar sepsis. El rol del  $\bullet\text{NO}$  en la base patogénica de estas alteraciones se reafirma por el reporte de elevadas concentraciones de  $\bullet\text{NO}$  y sus metabolitos en el líquido de edema pulmonar en pacientes con SDRA [145, 169]. Se ha estudiado la hiperproducción de  $\bullet\text{NO}$  en la progresión de la sepsis. La mayoría de los efectos nocivos del  $\bullet\text{NO}$  han sido atribuidos al  $\text{ONOO}^-$ , el cual se forma a velocidad limitada por difusión por la reacción de  $\bullet\text{NO}$  con  $\text{O}_2^-$  [101, 102, 162, 170]. El  $\text{ONOO}^-$  puede reaccionar con residuos de tirosina para formar 3-NT [101-103, 162, 170]. Como evidencia de la producción de estrés nitroxidativo se ha reportado la presencia de proteínas nitradas en el LBA y en plasma de pacientes con SDRA [111, 154, 171, 172].

Las elevadas concentraciones de  $\bullet\text{NO}$  que se observan en este estado patológico favorecen la reacción de  $\text{O}_2^-$  (una reacción controlada por difusión) [167] obteniéndose  $\text{ONOO}^-$  un poderoso oxidante y nitrante que conduce a la producción de estrés nitroxidativo [102, 167]. La acumulación de 3-NT refleja el estrés oxidativo debido a oxidantes derivados del  $\bullet\text{NO}$ , proceso denominado nitración proteica [173]. La injuria pulmonar inducida por la sepsis es un hallazgo clínicamente relevante en

pacientes con sepsis o en riesgo de sepsis[174]. En el SDRA, en la LPA y en el desarrollo de lesión pulmonar de la sepsis, se ha reportado un aumento de la producción de  $\bullet\text{NO}$  y sus metabolitos derivados en el líquido de edema pulmonar [172, 175]. Se han reportado concentraciones aumentadas de  $\text{NO}_3^-$  y proteína A de Surfactante nitrada en el líquido de edema pulmonar de pacientes con SDRA [169]. Se especula que productos derivados de  $\bullet\text{NO}$  se acumulan en los pulmones antes del inicio del SDRA, y persistirían en la evolución del SDRA. Por lo tanto las vías metabólicas dependientes de  $\bullet\text{NO}$  son importantes en los pulmones de los pacientes con SDRA [172].

La mayoría de los efectos perjudiciales de  $\bullet\text{NO}$  se han atribuido a  $\text{ONOO}^-$ , dado que este oxidante puede nitrar los residuos de tirosina que tienen funciones biológicas [103, 162]. Se han encontrado proteínas nitradas en el fluido de LBA y en el plasma de pacientes con SDRA [111, 172, 173, 176-178]. Se han detectado  $\bullet\text{NO}$  y sus metabolitos derivados en el pulmón en modelos animales de sepsis experimental y en pacientes humanos, por lo que se ha propuesto un rol potencial como biomarcadores del diagnóstico y pronóstico de sepsis [177, 179].

### **Daño nitrooxidativo de proteínas de membrana basal y matriz extracelular**

El SDRA es un proceso de enfermedad que se caracteriza por inflamación difusa en el parénquima pulmonar. La participación de mediadores inflamatorios en el SDRA ha sido objeto de una intensa investigación, y es probable que la lesión tisular mediada por oxidantes sea importante en la patogénesis del SDRA. En respuesta a varios estímulos inflamatorios, las células endoteliales pulmonares, las células alveolares y las células epiteliales de las vías respiratorias, así como los macrófagos alveolares activados, producen tanto  $\bullet\text{NO}$  como  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , que pueden reaccionar para formar  $\text{ONOO}^-$ , que puede nitrar y oxidar aminoácidos clave en varias proteínas pulmonares, como la proteína surfactante A, e inhiben sus funciones. Se ha demostrado que la nitración y la oxidación de una variedad de proteínas cruciales presentes en el espacio alveolar están asociadas con una función disminuida *in vitro* y también se han identificado *ex vivo* en proteínas de muestras de pacientes con LPA/SDRA. Diversas enzimas y captadores (scavengers) de bajo peso molecular que están presentes en el tejido pulmonar y el líquido de

revestimiento alveolar disminuyeron la concentración de estas especies tóxicas. Varios estudios que demuestran mayores niveles de intermedios reactivos de oxígeno y nitrógeno en los espacios alveolares de pacientes con ALI / ARDS[177].

La toxicidad mediada por oxidantes como resultado de la inflamación pulmonar aguda se ha demostrado en la lesión pulmonar aguda. El ONOO<sup>-</sup> un potente oxidante biológico, se forma por la reacción limitada por difusión del •NO con el O<sub>2</sub><sup>-•</sup>. Además de tener reactividad oxidativa de tipo radical hidroxilo, el ONOO<sup>-</sup> es capaz de nitrar anillos fenólicos, incluidos los residuos de tirosina asociados a proteínas. El óxido nítrico no nitra directamente los residuos de tirosina, por lo tanto, la demostración de residuos de 3-NT en los tejidos infiere la acción del ONOO<sup>-</sup> u oxidantes centrados en nitrógeno relacionados. Se obtuvo tejido pulmonar a partir de muestras de autopsia embebidas en parafina y fijadas en formalina, y se visualizaron anticuerpos policlonales y monoclonales específicos para 3-NT mediante tinción con diaminobencideno-peroxidasa. La lesión pulmonar aguda resultó en una intensa tinción en todo el pulmón, incluido el intersticio pulmonar, el epitelio alveolar, el exudado alveolar proteico y las células inflamatorias. Además, la tinción del endotelio vascular y los tejidos subendoteliales estaba presente en aquellos pacientes con lesión pulmonar aguda inducida por sepsis, lo que apoya un mecanismo de origen vascular. En las muestras de control sin enfermedad pulmonar manifiesta, solo hubo una leve tinción del tabique alveolar. Estos resultados demuestran que los oxidantes derivados del nitrógeno se forman en la lesión pulmonar aguda humana y sugieren que el ONOO<sup>-</sup> puede ser un oxidante importante en la enfermedad pulmonar inflamatoria, tanto a nivel alveolar como endovascular[180].

Las membranas basales son matrices extracelulares especializadas que subyacen a las células endoteliales en la pared de la arteria. La laminina, la glucoproteína de membrana basal más abundante, es un componente estructural y biológicamente activo. Datos considerables respaldan la formación de ONOO<sup>-</sup> en lesiones ateroscleróticas humanas, y una participación de este oxidante en el desarrollo de la aterosclerosis y la ruptura de la lesión. Estos efectos pueden estar mediados, al menos en parte, a través del daño de la matriz extracelular. Datos experimentales de tejidos humanos indican que la laminina se oxida por concentraciones equimolares o mayores de ONOO<sup>-</sup>, lo que resulta en cambios

estructurales y funcionales. Estas modificaciones y las interacciones comprometidas entre matriz y célula pueden contribuir a la disfunción de las células endoteliales, a un debilitamiento de la estructura de las lesiones ateroscleróticas y a una mayor propensión a la ruptura[181]. Se demostró la co-localización de 3-NT y la laminina en lesiones ateroscleróticas humanas. La modificación de los residuos involucrados en la autopólimerización de la laminina interfirió con la formación de polímeros ordenados como se detecta por microscopía electrónica de barrido. Estas modificaciones de laminina pueden contribuir a la disfunción de las células endoteliales y modular la estructura y el ensamblaje de las células endoteliales y por lo tanto contribuir a la aterogénesis[181].

La fibronectina es una glucoproteína dimérica presente tanto en el plasma humano como en las membranas basales. Estas últimas son matrices extracelulares especializadas que subyacen a las células endoteliales en la pared de la arteria. Evidencia considerable apoya la participación de  $\text{ONOO}^-$  en el desarrollo y la ruptura de la lesión aterosclerótica humana, posiblemente a través del daño de la matriz extracelular. Los estudios sobre lesiones ateroscleróticas humanas han proporcionado evidencia de la localización conjunta de 3-NT y fibronectina. La modificación de la fibronectina mediada por  $\text{ONOO}^-$  y las interacciones entre la matriz y la célula pueden contribuir a la disfunción de las células endoteliales, un debilitamiento de la capa fibrosa de las lesiones ateroscleróticas y una mayor propensión a la ruptura[182-184].

El proteoglicano perlecano de heparán sulfato (HS) es un componente importante de las membranas basales, desempeña un papel clave en la estructura de la matriz extracelular, interactúa con factores de crecimiento y moléculas de adhesión, y regula la adhesión, diferenciación y proliferación de las células vasculares. La aterosclerosis se caracteriza por la inflamación crónica y la presencia de materiales oxidados dentro de las lesiones, con la mayoría del daño proteico presente en la ECM, en lugar de las proteínas celulares. El debilitamiento de la estructura de ECM juega un papel clave en la ruptura de la lesión, la principal causa de ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares. Se demostró que el  $\text{ONOO}^-$  daña el perlecano tanto estructural como funcionalmente[185].

Tomando en conjunto la evidencia que se reporta es posible especular con la participación de las ERN en particular  $\text{ONOO}^-$  en la producción de edema pulmonar lesional tanto por daño endotelial como por alteraciones estructurales y funcionales de las proteínas de matriz extracelular pulmonar a nivel de la membrana alveolo capilar.

### **Nitración del surfactante pulmonar**

La nitración de los residuos de proteína tirosina por  $\text{ONOO}^-$  se ha implicado en una variedad de enfermedades inflamatorias como el SDRA. La proteína del surfactante pulmonar A (surfactante, SP-A) tiene múltiples funciones, incluida la defensa del huésped frente a infecciones. Se ha reportado que una mezcla de ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) induce la nitración, oxidación y cloración de los residuos de tirosina en SP-A humano e inhibe la capacidad de SP-A para agregar lípidos y unir manosa. En dicho experimento la nitración y oxidación de SP-A no se vio alterada por la presencia de lípidos, lo que sugiere que las proteínas son objetivos preferidos en mezclas ricas en lípidos como el surfactante pulmonar. Además, tanto la peroxidasa de rábano como la mieloperoxidasa (MPO) pueden utilizar  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustratos para catalizar la nitración de tirosina en SP-A e inhibir su función de agregación de lípidos. La nitración y oxidación de SP-A por MPO aumenta notablemente en presencia de concentraciones fisiológicas de  $\text{Cl}^-$ , y la función de agregación de lípidos de SP-A se elimina por completo. Estos resultados sugieren que la MPO liberada por los neutrófilos activados durante la inflamación utiliza niveles fisiológicos o patológicos de  $\text{NO}_2^-$  para nitrar las proteínas, y puede proporcionar un mecanismo adicional, además de la formación de  $\text{ONOO}^-$  para la lesión tisular en el SDRA y otras enfermedades inflamatorias asociadas con sobreproducción de  $\bullet\text{NO}$  y producción de ERN [186]. La proteína del surfactante pulmonar D (SP-D) es un importante efector de la inmunidad innata. Se ha demostrado que SP-D se acumula en sitios de infección bacteriana aguda e infiltración de neutrófilos, en un entorno asociado con la liberación de ERN como el  $\text{ONOO}^-$ . La incubación de dominios de lectina SP-D nativos o SP-D triméricos con  $\text{ONOO}^-$  dio como resultado nitración y reticulación por puentes no disulfuro. Las modificaciones fueron bloqueadas por los eliminadores de  $\text{ONOO}^-$  o la inactivación por pH del  $\text{ONOO}^-$ , la espectroscopía de masas confirmó la nitración de los residuos de tirosina conservados dentro C-terminal y de los dominios de lectina del SP-D. La

incubación de dodecameros SP-D o el lavado alveolar murino con  $\text{ONOO}^-$  disminuyó la agregación dependiente de SP-D de agregados con lipopolisacárido, lo que respalda hipótesis de que la agregación defectuosa resulta de un enlace químico anormal. Se ha observado que la nitración, reticulación de SP-D y una disminución significativa en la actividad de agregación dependiente de SP-D en el lavado pulmonar de ratones expuestos de manera aguda al dióxido de nitrógeno. Por lo tanto, la modificación de SP-D por especies reactivas de oxígeno-nitrógeno podría contribuir a alteraciones en la estructura y función de SP-D en sitios de inflamación in vivo[187].

No se han identificado las condiciones bajo las cuales el  $\bullet\text{NO}$  puede modular o promover la lesión pulmonar. La lesión inducida por  $\bullet\text{NO}$  resulta del  $\text{ONOO}^-$ , formado por la reacción de  $\bullet\text{NO}$  con  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . La generación simultánea de  $\bullet\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  por 3-morfolinonitronimina (SIN-1, 0,1-2 mM) resultó en la oxidación de dihidrorodamina, un marcador de producción de  $\text{ONOO}^-$  y una disminución dependiente de la dosis en la capacidad de SP-A para mejorar la agregación de lípidos. El análisis de transferencia Western de muestras de SP-A expuestas a SIN-1, superpuestas con un anticuerpo policlonal contra 3-NT, fue consistente con la nitración de los residuos de tirosina de SP-A. La superóxido dismutasa (100 U/ ml), la L-cisteína (5 mM), la xantina oxidasa (10 mU/ml) y la xantina (500  $\mu\text{M}$ ) o el urato (100  $\mu\text{M}$ ) impidieron la oxidación de la dihidrorodamina inducida por SIN-1 y modificaciones en SP-A.  $\bullet\text{NO}$  solo, generado por S-nitroso-N-acetilpenicilamina más 100  $\mu\text{M}$  L-cisteína, o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y peróxido de hidrógeno, generado por pterina y xantina oxidasa en ausencia de hierro, no dañó el SP-A ni oxidó la dihidrorodamina. Por lo tanto el  $\text{ONOO}^-$ , pero no el  $\bullet\text{NO}$  o el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y el peróxido de hidrógeno, en concentraciones que pueden encontrarse in vivo, causan la formación de 3-NT y disminuyeron la capacidad de SP-A para agregar lípidos[161]. En pacientes con LPA temprana y en pacientes con edema pulmonar hidrostático se midieron los niveles  $\text{NO}_x^-$  en el líquido para edema pulmonar y plasma. El fluido de edema pulmonar de pacientes con LPA tenía niveles significativamente más altos de  $\text{NO}_x^-$  en comparación con el fluido de edema pulmonar de pacientes con edema pulmonar hidrostático. Junto con estos hallazgos la proteína tensioactiva pulmonar nitrada A (SP-A) también se detectó en el líquido de edema de pacientes con LPA. En conjunto esto indica que las ERN y ERO desempeñan un rol en la patogénesis de la

LPA humana[188]. La infección *Mycoplasma pneumoniae* es una de las principales causas de neumonía y exacerba otras enfermedades respiratorias en humanos. El rol potencial de la proteína surfactante (SP) A en la defensa contra *mycoplasma pneumoniae* fue estudiado usando macrófagos alveolares (MA) de ratones de una cepa modificada altamente resistente a las infecciones de *Mycoplasma pneumoniae*. Los macrófagos alveolares (MA), activados con interferón (IFN)  $\gamma$  e incubadas con SP-A, produjeron cantidades significativas de  $\bullet$ NO y efectuó una disminución del 83% en las unidades formadoras de colonias de *mycoplasma pneumoniae* (UFC) a las 6 horas después de la infección. La preincubación de MA con el inhibidor de la óxido nítrico sintasa inducible NG-monometil-L-arginina abolió la producción de  $\bullet$ NO y la muerte mediada por SP-A de *mycoplasmas*. No se observó disminución en las UFC cuando los macrófagos activados por IFN- $\gamma$  se infectaron con *mycoplasmas* en ausencia de SP-A a pesar de la producción significativa de  $\bullet$ NO. Estos resultados demuestran que SP-A media la muerte de *mycoplasmas* por MA, posiblemente a través de un mecanismo dependiente de  $\bullet$ NO [189]. La nitración de la apoproteína tensioactiva (SP) humana A altera su capacidad de unirse a sacáridos que contienen manosa en *Pneumocystis carinii* y su papel potencial en la mediación de la adherencia de *Pneumocystis carinii* a los macrófagos alveolares. La nitración de SP-A interfiere con su capacidad de servir como ligando para la adherencia de *Pneumocystis carinii* a los macrófagos alveolares en el sitio de interacción de la molécula de SP-A. con *Pneumocystis carinii*. La nitración del surfactante humano fue demostrada por exposición de surfactante con ERN producido por macrófagos estimulados con lipopolisacárido. Estos hallazgos indican que los niveles fisiológicos de ONOO $^-$ , producidos por MA activados, nitrán SP-A y que el CO $_2$  aumenta la nitración, al menos parcialmente, al mejorar la producción enzimática de  $\bullet$ NO. Al mismo tiempo se observa una disminución de la capacidad de surfactante para agregar lipidos lo que altera su función a nivel pulmonar [188, 190-192].

Por la elevada mortalidad de la sepsis con disfunción pulmonar es de interés contar con biomarcadores de lesión que detecten precozmente el desarrollo de complicaciones [21, 193]. Es posible que exista aumento de  $\bullet$ NO, ERN y ERO tanto a nivel pulmonar como sistémico en pacientes sépticos con menor grado de injuria pulmonar. Además,  $\bullet$ NO podría estar elevado en pacientes en ventilación mecánica sin sepsis y sin injuria pulmonar aguda.



### III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

#### **Hipótesis sobre el estrés nitroxidativo en sepsis e injuria pulmonar**

Dado que la producción de  $\bullet\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  es estimulada por mediadores inflamatorios en sepsis y por varios estímulos biofísicos inducidos por la ventilación mecánica [130], nuestra hipótesis es que durante la sepsis se produce estrés nitroxidativo pulmonar. Es posible además que el  $\bullet\text{NO}$  sea producido en el pulmón durante la sepsis sin SDRA y que la ventilación mecánica induzca la producción de  $\bullet\text{NO}$  a nivel pulmonar en pacientes sin SDRA y sin sepsis. Puede existir correlación entre la producción de  $\bullet\text{NO}$ , estrés oxidativo y el grado de disfunción orgánica en sepsis y ventilación mecánica. Además, investigamos si el estrés nitroxidativo pulmonar está asociado con la mortalidad en UCI en pacientes en ventilación mecánica.

De acuerdo a lo anterior, medimos los metabolitos derivados de  $\bullet\text{NO}$ , 3-NT, MDA en LBA y metabolitos derivados de  $\bullet\text{NO}$ , MDA,  $\alpha\text{-TOH}$  en plasma de pacientes con sepsis y en pacientes en ventilación mecánica sin sepsis y sin injuria pulmonar aguda o SDRA.

#### **Desarrollo del estudio**

Debe existir necesariamente un intermediario de lesión que esté presente en la sangre en concentraciones determinadas; debe de llegar al pulmón, y en él también encontrarse en determinada cantidad para lesionarlo.

Para establecer con alguna base firme la relación entre sepsis severa, mediadores y LPA/SDRA deben ser demostradas varias cosas:

- 1) presencia de los mediadores en la sangre del paciente portador de sepsis,
- 2) presencia de los mediadores en el pulmón lesionado,



3) ausencia de los mediadores en el pulmón no lesionado. Para establecer alguna especificidad en la relación debemos demostrar ausencia o su presencia en menor concentración del mediador en lesiones pulmonares diferentes al LPA/SDRA.

Para evaluar la participación del propio pulmón lesionado como productor de los mediadores debemos estudiar su presencia o presencia en menor grado en el LPA/SDRA no causado por sepsis, o sea en ausencia de infección.

### **Objetivo general**

Estudio del estrés nitroxidativo pulmonar y sistémico en pacientes con sepsis y en ventilación mecánica.

### **Objetivos específicos.**

1- Demostrar que sepsis se asocia con aumento del estrés nitroxidativo sistémico y pulmonar.

2- Demostrar que el daño pulmonar lesional en la Sepsis se asocia con estrés nitroxidativo pulmonar aumentado en relación a los pacientes que no tienen SDRA/LPA. Demostrar que existe diferencia de estrés nitroxidativo en los diferentes estadios de la clasificación de Berlín

3- Demostrar la presencia de estrés nitroxidativo en pacientes en ventilación mecánica sin LPA/SDRA

4-Demostrar que el estrés nitroxidativo se asocia con la evolución en los pacientes en ventilación mecánica con y sin sepsis.

#### IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MATERIALES Y METODOS.

En nuestro estudio nos dedicaremos a:

- Estudiar la presencia de productos del metabolismo nitrooxidativo en sangre
- Estudiar la presencia de productos del metabolismo nitrooxidativo en líquido de lavado bronquioloalveolar
- Cuantificar su concentración
- Evaluar lo anterior en los distintos subgrupos de pacientes
- Finalmente trataremos - en base a los datos obtenidos - de establecer una relación entre los niveles de los productos y su asociación con la aparición y la evolución de la lesión pulmonar.
- Relacionar la presencia de los productos del metabolismo nitrooxidativo con el pronóstico en UCI.

##### **Diseño del estudio:**

**Prospectivo, observacional no intervencionista.** Se incluyó una muestra de conveniencia de pacientes críticos después del ingreso en la UCI. La exposición fue sepsis, nuestra principal variable de resultado fue la mortalidad en la UCI. Se obtuvieron muestras de sangre y líquido de LBA después de la inclusión de cada paciente en el estudio.

**Lugar del estudio:** Unidad de cuidados críticos de diez camas en el Hospital Universitario, Hospital de Clínicas.

**Participantes:** Pacientes de cuidados críticos ingresados en unidad de cuidados intensivos.

**Población:** se estudiarán pacientes internados en CTI que presenten sepsis de acuerdo a definiciones internacionales[1, 9, 10, 194]. Para su estudio se dividirán en grupos para estudiar las hipótesis planteadas. Los grupos de estudio serán los siguientes:

1. pacientes con sepsis de menos de 48 horas de evolución con LPA/SDRA
2. pacientes con sepsis de menos de 48 horas de evolución sin LPA/SDRA

3. Grupo control de pacientes en ARM sin LPA/SDRA (grupo control ARM)
4. Grupo de pacientes sin patología respiratoria previa no fumadores. Se realizará LBA luego de intubación orotraqueal previa al acto quirúrgico de coordinación (grupo control sanos)

### **Criterios de inclusión**

Pacientes que presenten sepsis o shock séptico de acuerdo a las definiciones de ACCP/SCCM [8, 194]. Pacientes con LPA/SDRA definidos por criterios internacionales[29-31, 195]. Sepsis fue definida de acuerdo al Comité de Consenso Europeo Americano[8] . LPA/SDRA se definió de acuerdo a los criterios de la Conferencia de Berlín [30, 196]. La severidad del compromiso pulmonar se valoró por el score de Murray y por la definición de Berlín [29, 30, 195]. Para evaluar el grado de disfunción orgánica se usó el score de Marshall y el score de valoración de la falla orgánica secuencial [10, 15]. La severidad de compromiso funcional global al ingreso a UCI fue evaluada de acuerdo al score APACHE II [197]. Todos los pacientes estaban sedados y ventilados.

### **Criterios de exclusión.**

- Shock séptico refractario a vasoactivos
- Insuficiencia cardíaca terminal
- Infarto agudo de miocardio de menos de 48 horas de evolución
- Arritmias ventriculares graves
- Arritmias supraventriculares rápidas
- Reanimación cardiopulmonar prolongada
- Sepsis de más de 48 horas de evolución
- Trastorno severo de la crisis con síndrome hemorrágico
- Contraindicaciones para sedación
- Inestabilidad hemodinámica a pesar del uso de inotrópicos

## **Selección de pacientes**

Pacientes sépticos y pacientes en VM fueron incluidos en el estudio entre Setiembre del 2000 y Junio del 2003. La evaluación y elección de los pacientes se muestra en la figura 12.

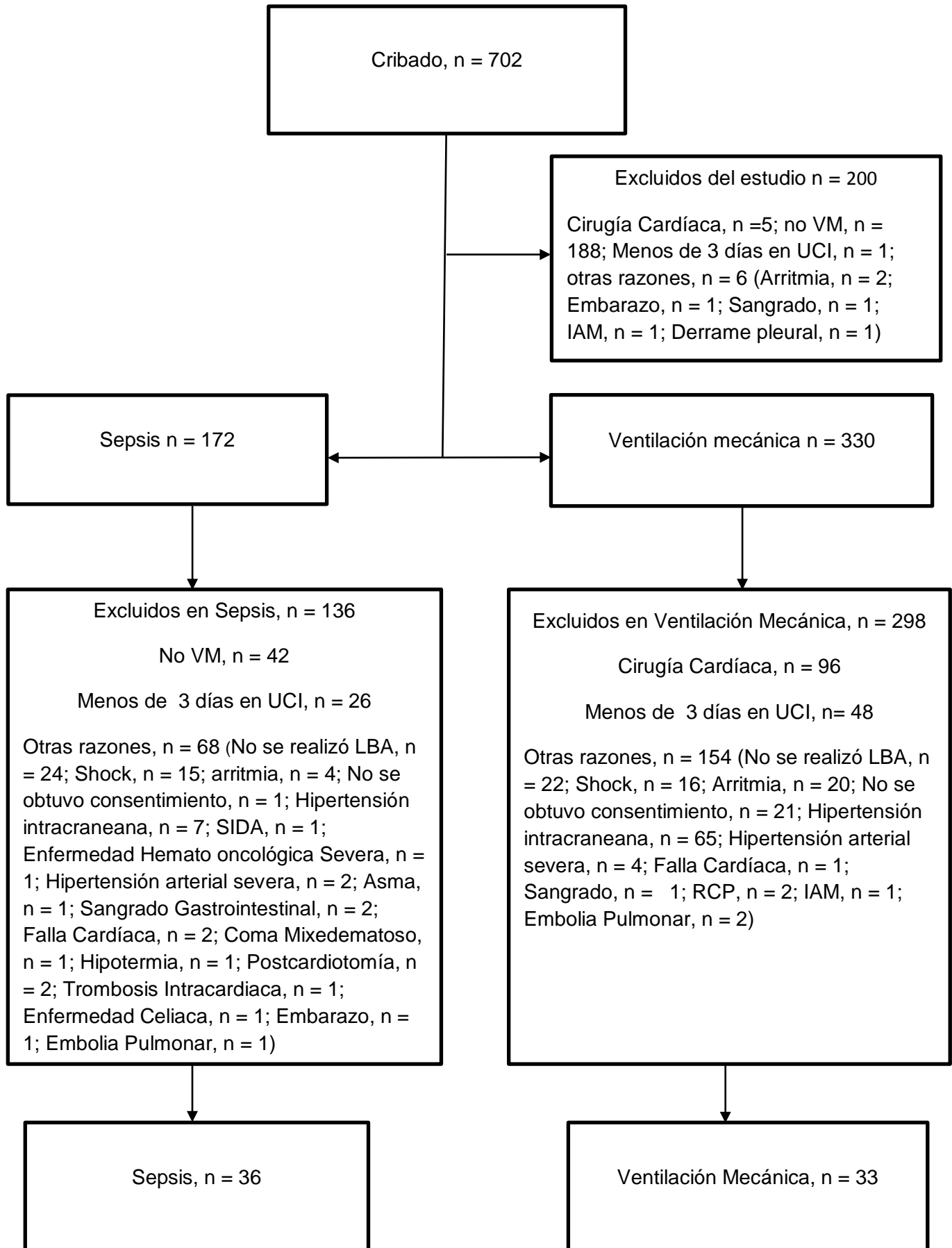


Figura 12. Diagrama de inclusión y exclusión de pacientes. IAM, infarto agudo de miocardio; LBA, lavado bronquiolo alveolar; UCI, unidad de cuidado intensivo; VM, ventilación mecánica; RCP, reanimación cardiopulmonar; SIDA, síndrome de inmunodeficiencia adquirido

### **Pacientes del grupo sepsis**

Se incluyeron pacientes sépticos durante las primeras 48 horas luego de ingreso a UCI (n = 36). La definición de acuerdo a los consensos internacionales se definió de acuerdo con los Criterios del Consenso Europeo Americano [8]. La gravedad de la enfermedad se evaluó mediante la puntuación APACHE II [197] [56]. El síndrome de disfunción orgánica múltiple se evaluó mediante la puntuación de disfunción orgánica múltiple (MODS) [15]. La lesión pulmonar fue evaluada por los criterios del Comité de Consenso Europeo de Estados Unidos [198], por la puntuación de gravedad de Lesión Pulmonar de Murray (lung injury severity score, LISS) y por la definición del consenso de Berlín [29, 199]. Todos los pacientes estaban ventilados y sedados.

Se excluyó a los pacientes si cumplían con uno o más de los siguientes criterios: embarazo, reanimación de larga duración, arritmias potencialmente mortales, infarto agudo de miocardio con menos de cuarenta y ocho horas de evolución, trastorno hemorrágico y negativa a participar. Un  $PaO_2/FiO_2$  menor de 100 fue un criterio de exclusión para el procedimiento de lavado bronquioloalveolar (LBA).

### **Pacientes en ventilación mecánica sin sepsis**

Los pacientes sometidos a ventilación mecánica (grupo VM, n = 33) durante menos de 72 horas, sin sepsis o LPA/SDRA se seleccionaron como grupo de control de ventilación mecánica. El procedimiento de LBA se realizó después de la inclusión al estudio. Todos los parámetros ventilatorios se registraron a partir de las lecturas del ventilador.

## **Grupo de control en block quirúrgico**

Después de la inducción de la anestesia en el quirófano, se tomaron muestras de sangre y LBA de 8 pacientes sin enfermedad pulmonar.

### **Instrumentación.**

Recolección de datos. Al ingreso del paciente en el estudio se registró su ficha patronímica y el diagnóstico clínico. Se anotaron también las variables para elaborar los scores pronósticos APACHE II, score de Murray, score de Marshall, y score de SOFA. En planillas separadas se anotaron las variables hemodinámicas y paraclínicas.

Intervenciones. Serán las efectuadas por el equipo tratante para el sostén vital de estos pacientes. ARM (Puritan Bennett 7200, Amadeus- Hamilton medical), vasoactivos e inotrópicos, sedación y analgesia

### **Variables**

Medimos variables clínicas, evolutivas, fisiológicas, y variables bioquímicas relacionadas con la producción de óxido nítrico y estrés nitroxidativo en plasma y líquido de LBA.

### **Bioética**

El presente estudio se realizó con la aprobación del Comité de Bioética del Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República y de conformidad con la declaración de Helsinki sobre los principios éticos de la investigación médica en sujetos humanos. Se requirió el consentimiento informado de familiar más cercano o persona idónea. Para ello se entregó un formulario con información de la situación del paciente y de los objetivos y procedimientos a realizar en el estudio.

Familiares, allegados, o voluntarios firmaron el consentimiento informado. Asimismo se solicitó consentimiento para realizar la recolección de muestras en los sujetos control sanos.

Como criterios de exclusión se usaron: embarazo, resucitación cardiopulmonar prolongada, infarto agudo de miocardio con menos de 48 horas de evolución, arritmias con riesgo de vida, shock séptico refractario a pesar del uso de inotrópicos y vasoactivos, sangrado profuso, enfermedad pulmonar crónica severa. Un  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  menor de 100 fue un criterio de exclusión para efectuar LBA.

Las características clínicas de los pacientes se muestran en la tabla 1. Los pacientes estuvieron estables durante la extracción de la muestras y no recibieron terapéutica adicional en ese período. Cuando se incluyó un paciente en el estudio se registraron las variables clínicas, se extrajo sangre y se realizó LBA.

### **Protocolo de lavado bronquioloalveolar**

El líquido de LBA de pacientes sépticos se obtuvo dentro de las 48 horas y 72 horas posteriores al ingreso en la UCI en pacientes del grupo sepsis y grupo ventilación mecánica respectivamente. El LBA se efectuó pasando una sonda de 14 F a través del tubo endotraqueal e instilando 5 alícuotas de 20 mL de solución salina fisiológica y aspirando secuencialmente. Durante el procedimiento se monitorizó la oximetría de pulso, la presión arterial, frecuencia cardíaca, y temperatura. Antes del LBA, se colocó el ventilador en  $\text{FiO}_2$  100%, y se administraron sedantes y paralizantes. Todos los pacientes fueron sedados y preoxigenados durante 10 minutos antes del procedimiento de LBA ( $\text{FIO}_2 = 1.0$ ). Se insertó un catéter independiente a través del tubo endotraqueal hasta que se alcanzó una posición de cuña, luego se inyectaron 100 ml de solución salina normal dividida en cinco alícuotas, luego de 20 segundos se aspiró cada alícuota y se congeló para el análisis posterior. El líquido de LBA fue filtrado a través de gasa estéril para retirar el mucus. Luego fue centrifugado a 1000 g por 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante fue almacenado a -70°C grados hasta su análisis. La concentración de proteínas se midió por el método del ácido biscinconínico (BCA). Para evitar la oxidación de las muestras los tubos estaban suplementados con Butilhidroxitolueno (BHT) y



Deferroxamina. La extracción de sangre se realizó antes del LBA. Las muestras se obtuvieron de la vía arterial. La sangre se colocó en tubos suplementados con antioxidantes. La sangre se centrifugó a 4 °C para extraer el plasma, luego de esto el plasma se almacenó a - 20 °C hasta su medición.

## Reactivos

Cloruro de Vanadio, *N*-(1-naftil) etilendiamina, Sulfanilamida, ácido tiobarbitúrico, Butilhidroxitolueno, metanol, ácido fosfórico, hidróxido de sodio, tetrametoxipropano, Tween-20, PBS, solución salina tamponada con fosfato,  $\alpha$ -tocopherol. Anticuerpo policlonal anti 3-NT fue purificado en nuestro laboratorio (M. Naviliat). Anticuerpo secundario anti Ig G de conejo de Sigma Aldrich.

## Medida de Nitrito y nitrato

$\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  fueron medidos por el método de Griess/cloruro de Vanadio. 100  $\mu\text{L}$  de plasma o LBA se agregaron a los reactivos N y S (reactivo de Griess), se incubó 30 minutos a temperatura ambiente[200]. Luego la concentración se determinó por lectura de absorbancia a 540 nm. El método se basa en la diazotación de sulfanilamida por  $\text{NO}_2^-$  en pH ácido y la reacción posterior con *N*-(1-naftilo) etilendiamina para producir un producto de color rosa intenso con absorción máxima a 540 nm. La concentración de  $\text{NO}_2^-$  se calculó con estándares de  $\text{NaNO}_2$ . El  $\text{NO}_3^-$  en las muestra fue reducido a  $\text{NO}_2^-$  con cloruro de vanadio antes de agregar el reactivo de Griess. La eficiencia de la reducción de  $\text{NO}_3^-$  fue valorada por la construcción de curvas de calibración con estándar de  $\text{NO}_3^-$ . La eficiencia estuvo por encima de 85% y la curva fue lineal entre 1 a 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_3^-$ . Para evitar la interferencia de las proteínas en la muestra, se precipitaron las proteínas con metanol a 4°C y centrifugadas a 10000 g por 12 minutos.  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  se midieron en el sobrenadante por el método de Griess luego de reducción con  $\text{VCl}_3$ . Límite inferior de detección fue 1  $\mu\text{M}$ . Las concentraciones de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  se expresaron en  $\mu\text{mol/L}$  ( $\mu\text{M}$ ) de plasma o LBA.

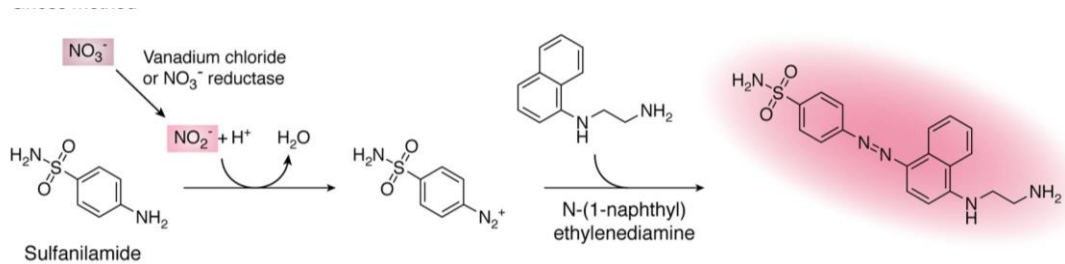
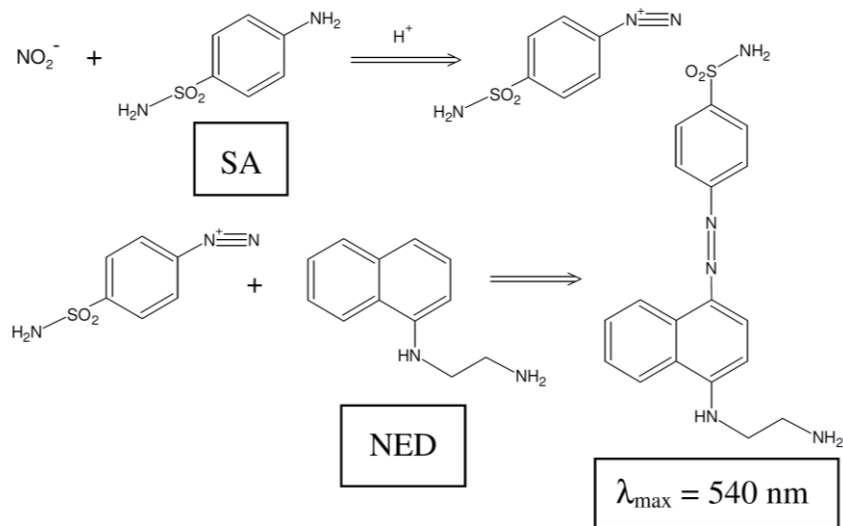


Figura 13. Reacción de Griess. Panel superior reacción de  $\text{NO}_2^-$  con reactivos de Griess; SA, sulfanildiamida; NED, naftiletilendiamina. En el panel inferior se muestra la reducción de  $\text{NO}_3^-$  con cloruro de Vanadio generando  $\text{NO}_2^-$  que reacciona con sulfanilamida y naftiletilendiamina para generar un compuesto que absorbe a 540 nm[201]

## Medida de malondialdehído

El nivel de MDA en muestras biológicas generalmente se evalúa mediante el ensayo de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). En la reacción MDA de un muestra biológica se derivatiza con TBA, formando un aducto MDA-TBA<sub>2</sub>, un complejo rojo (Fig 12). La concentración del aducto MDA-TBA<sub>2</sub> puede determinarse por espectrofotometría o espectrofluorimetría. Sin embargo, el método ha sido criticado por su baja sensibilidad y selectividad dado que varias especies no relacionadas con la producción de MDA de muestras biológicas pueden reaccionar con TBA [67, 202] y dar falsos positivos y concentraciones aumentadas. Además, es posible la generación artificial de MDA durante el ensayo [203, 204]. A pesar de todos los problemas mencionados, el ensayo TBA es un método todavía ampliamente utilizado para controlar el nivel de lipoperoxidación en muestras biológicas. Por lo tanto, en nuestro estudio optimizamos un método de HPLC basado en el ensayo TBA que es simple, preciso y sensible y se puede aplicar a diferentes muestras biológicas, tales como plasma, líquidos biológicos (lavado bronquioloalveolar), y células en cultivo

Considerando lo anterior en nuestro trabajo el MDA se midió utilizando un método modificado adaptado de [205-209]. Brevemente, se dejó reaccionar 100 µl de muestras durante 60 minutos a 90°C con ácido tiobarbitúrico para formar un aducto de MDA-2TBA estable. Luego se colocaron los tubos en agua fría durante treinta minutos. Posteriormente, la fracción lipídica se extrajo con metanol centrifugando a 4 °C a 10.000 rpm durante diez minutos. Se inyectaron cincuenta microlitros del sobrenadante en un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Posteriormente se preparó una solución de dihidrógeno fosfato de potasio de 10 mmol/L y se ajustó a pH 6,8 con 2.0 mmol/L de hidróxido de potasio. La fase móvil consistió en 60:40 (vol.) 10 mmol/L de dihidrógeno fosfato de potasio, pH 6.8: metanol. La fase móvil se desgasificó al vacío y se filtró.

Tratamiento de la muestra. Agregamos 100 µL de plasma o 200 µL de líquido de LBA a un tubo Pyrex de 10 ml que contenía 700 µL de ácido fosfórico al 1% y mezclado con vórtice durante 10 s. Luego agregamos 200 µL de solución de 42

mmol/L de 2-TBA, atornillamos la tapa y mezclamos en vórtex la muestra durante 10 s, y luego la calentamos durante 60 minutos en un baño de agua a 100 °C. La muestra se mantuvo en agua helada hasta 10 minutos antes del análisis por HPLC. En ese momento, la muestra se mezcló con vórtice y se transfirieron 200  $\mu$ L a un tubo Eppendorf de 2,5 ml que contenía 200  $\mu$ L de 1:12 (vol.) 2 mol / L de hidróxido de sodio: metanol. La muestra se mezcló con vórtex durante 10 s y se centrifugó durante 10 min a 10.000 g. Inyectamos 50  $\mu$ L del sobrenadante en la columna. El flujo se ajustó a 0,5 ml / min. El aducto de MDA-TBA en el efluente de la columna se cuantificó por detección de fluorescencia, con excitación a 532 nm y emisión a 553 nm y con ganancia X 100. Se registraron los cromatogramas y se determinaron las áreas de los picos de cromatogramas utilizando el software del sistema Unipoint. Se preparó una solución de calibración a partir de TMP solubilizada en agua. TMP por hidrólisis libera cantidades estequiométricas de MDA. La concentración de MDA se determinó midiendo la absorbancia a 532 nm ( $\epsilon = 1600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Se construyó una curva de calibración diluyendo la solución de TMP.

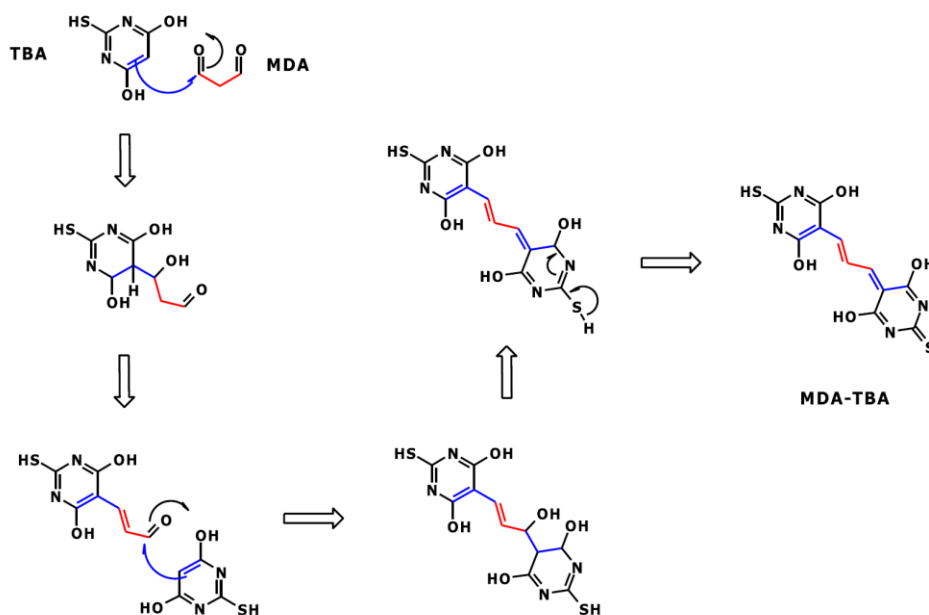


Figura 14. Reacción del ácido tiobarbitúrico con MDA, representando una sustancia reactiva con TBA para formar un compuesto que absorbe la luz visible y un compuesto MDA-(TBA)<sub>2</sub> el que es intensamente fluorescente. Tomado de Tsikas 2017 [66].

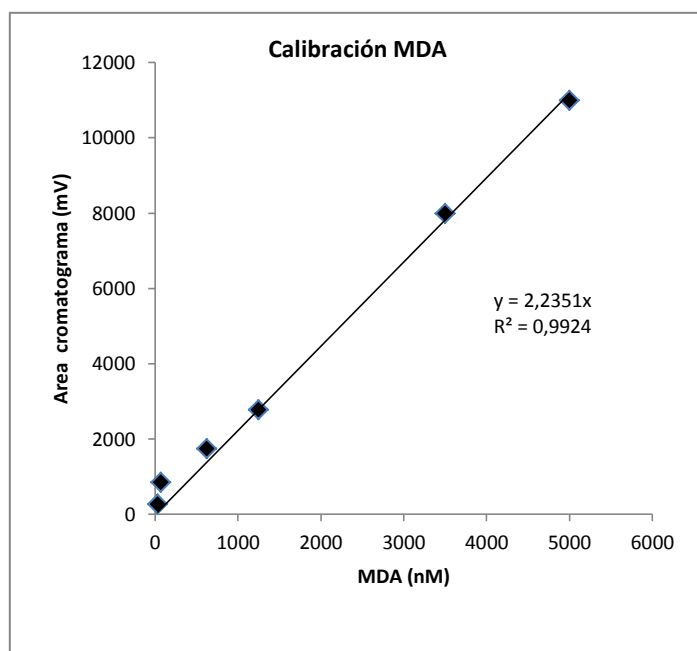


Figura 15. Curva de calibración de MDA.

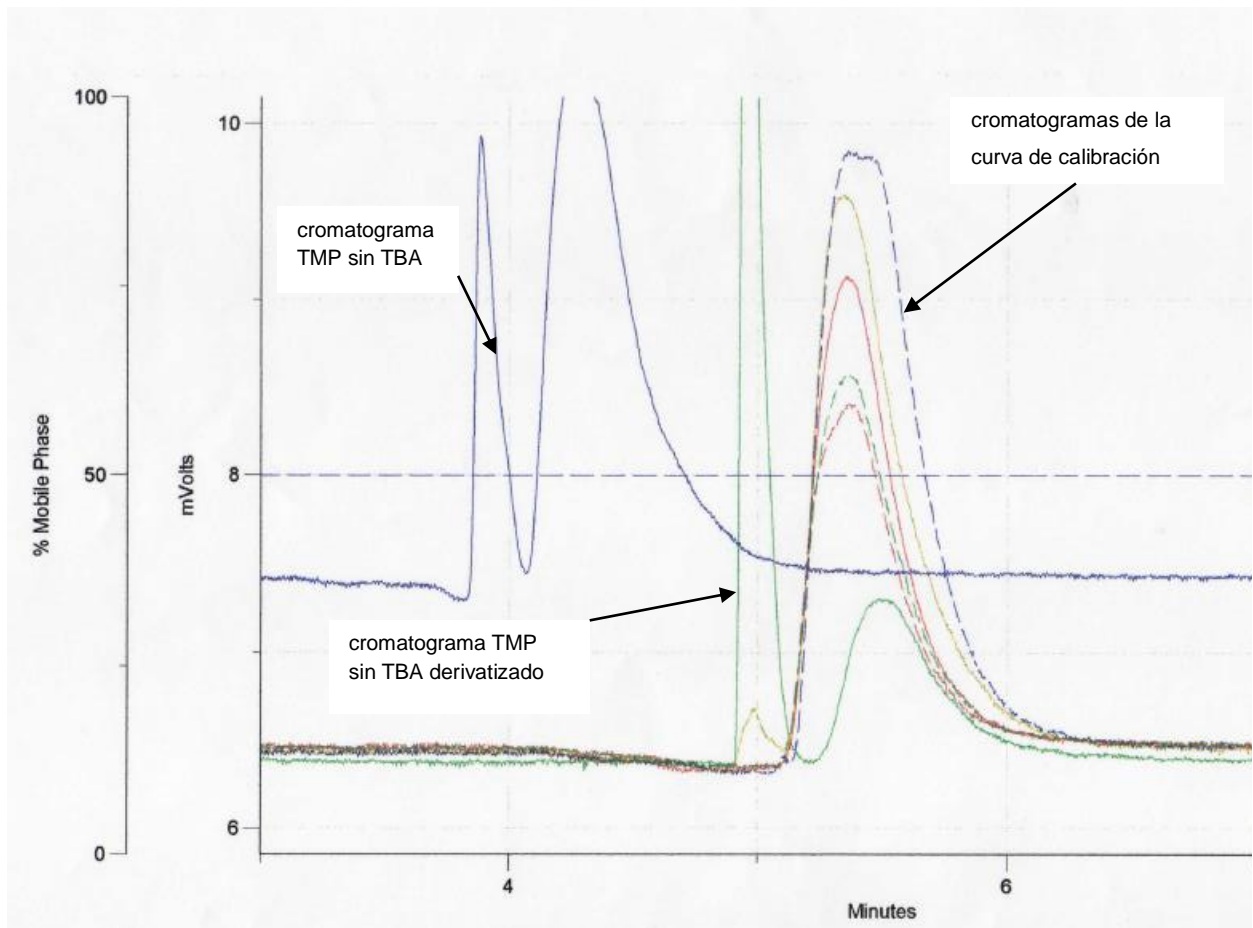


Figura 16 A. Cromatogramas de determinación de MDA.

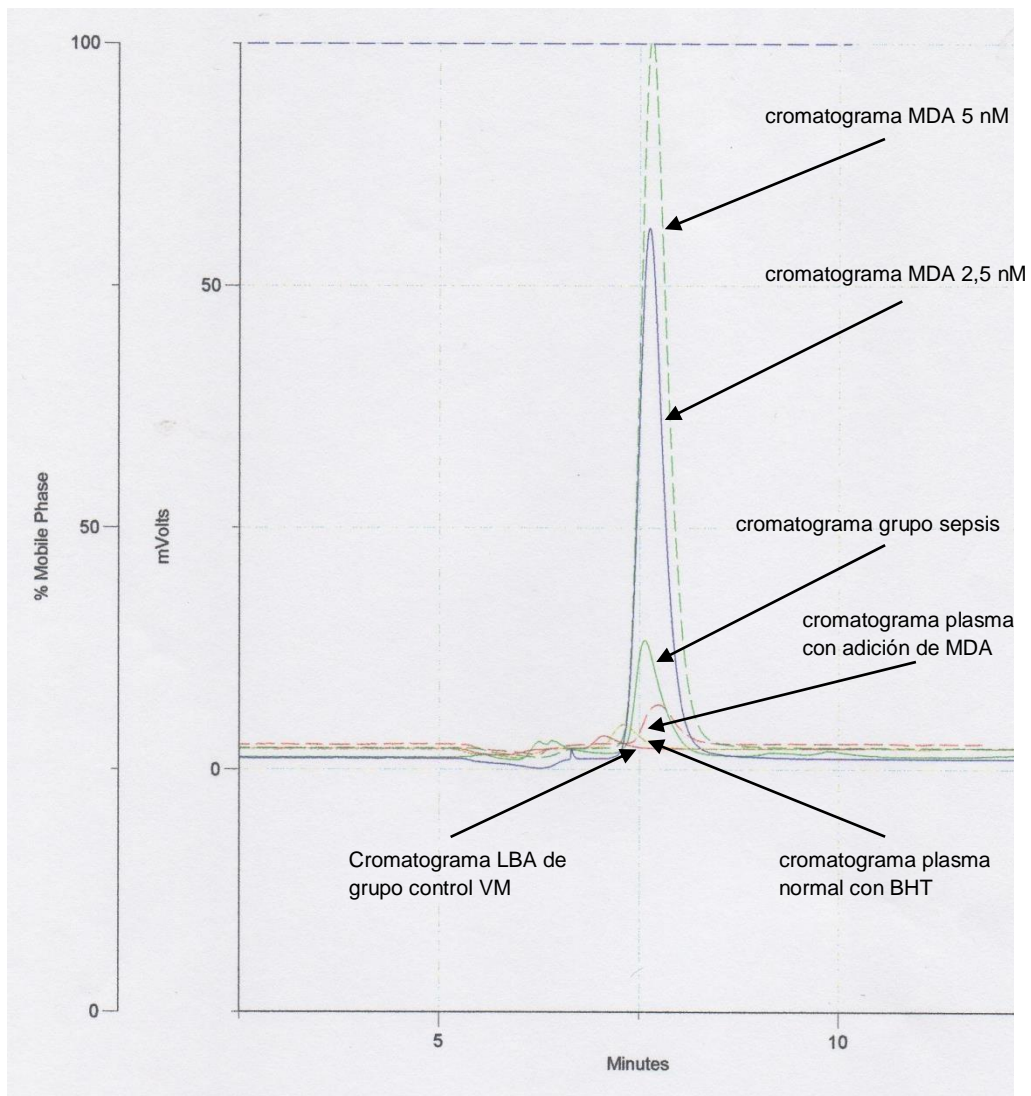


Figura 16 B. Cromatogramas de determinación de MDA.

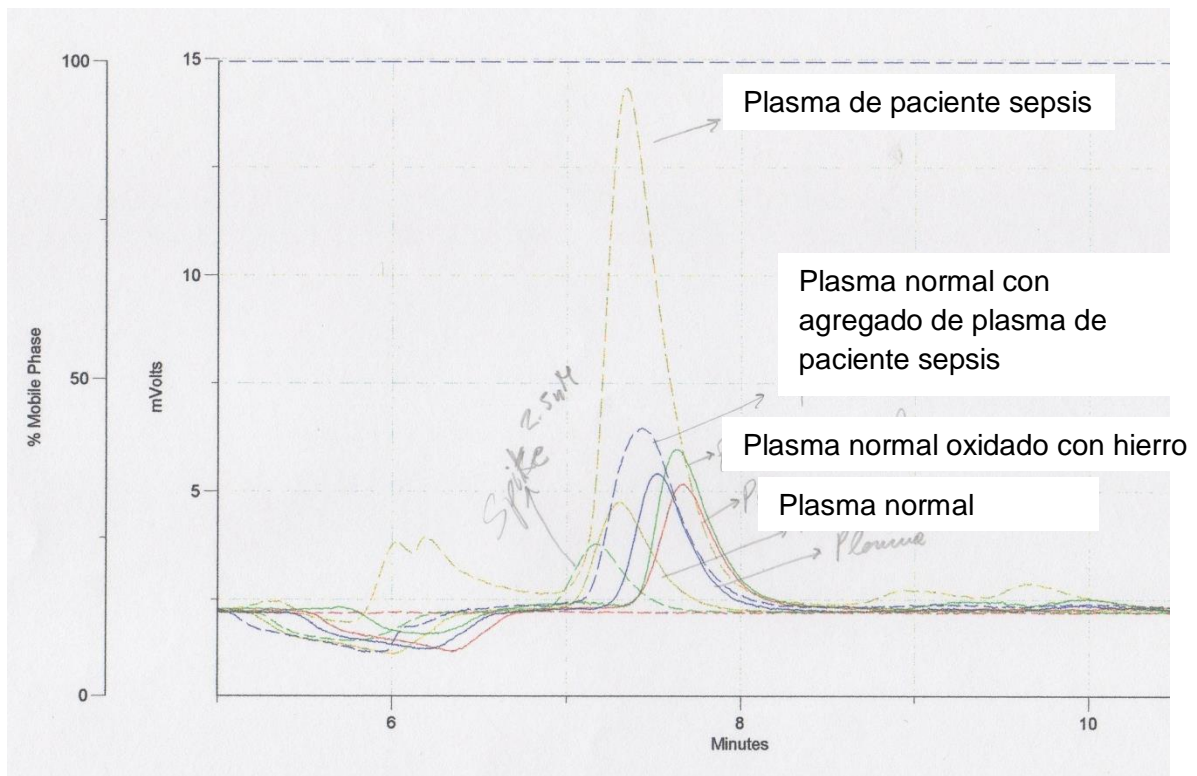


Figura 16 C. Cromatogramas de determinación de MDA. Cromatograma color rojo plasma normal; cromatograma color verde plasma normal oxidado con Fe; cromatograma color azul plasma normal sin BHT; cromatograma color rojo claro plasma normal con BHT; cromatograma color rojo con guiones plasma con adición de MDA 2,5 nM; cromatograma color verde con guiones plasma MDA 2,5 nM; cromatograma color azul con guiones plasma normal con adición de plasma séptico; cromatograma color rojo claro con guiones plasma de paciente séptico



## Medición de 3-nitrotirosina unida a proteínas

3-NT se midió mediante ELISA [210]. Como estándar se usó BSA (bovine serum albumin) nitrada con  $\text{ONOO}^-$ . Se nitró 1 mg/ml de BSA con  $\text{ONOO}^-$  1 mM en tampón fosfato 50 mM y tampón carbonato 10 mM a temperatura ambiente. Después de diluir BSA en buffer carbonato pH 10.0, se calculó la cantidad de 3-NT en BSA midiendo la absorbancia a 430 nm ( $\epsilon = 4400 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). El número de tirosinas nitradas en cada molécula de BSA se calculó dividiendo la concentración de proteína de 3-NT medida a 432 nm por BSA medida a 279 (1 g/L de BSA = 0,667 unidades de absorbancia). 100  $\mu\text{l}$  de muestras biológicas se colocaron en microplacas y se dejaron durante la noche. Después de eso, cada pocillo se enjuagó tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se bloqueó con gelatina al 5 % (preparado en PBS) durante 60 min a 37°C. Después de bloquear, la microplaca se enjuagó cinco veces con una solución de PBS-Tween 20 (0,05%). Luego, se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de una solución 1/1000 de un anticuerpo policlonal anti-3-NT y se incubaron durante 120 minutos a 37°C. Después de eso, la microplaca se enjuagó cinco veces con PBS-Tween 20 (0,05%). Se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de 1/2000 Ig-G anti-conejo secundario, anticuerpo completo específico de la especie ligado a la peroxidasa (de burro) y se incubó durante 60 min a 37°C. Después de enjuagar cinco veces, 100  $\mu\text{L}$  de o-fenildiamina (10 mg de o-fenildiamina en buffer de citrato 100 mM/L más 30% de peróxido de hidrógeno 10  $\mu\text{L}$ ). Después de 15 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detuvo agregando 2 mL de ácido clorhídrico. La absorbancia se midió a 492 nm. La concentración de 3-NT se calculó a partir de una curva de calibración construida con albúmina nitrada bovina (BSA). 3-NT en las muestras biológicas se calculó relacionando los valores de absorbancia de ELISA de la muestra con los valores de absorbancia de ELISA de la curva de calibración. Para maximizar la adherencia de la proteína a la superficie de la microplaca, las muestras biológicas se diluyeron a una concentración final de 20  $\mu\text{g/mL}$  antes del ensayo 3-NT. La concentración final de 3-NT se normalizó a la concentración de proteína y se expresó como pmoL/mg de proteína.

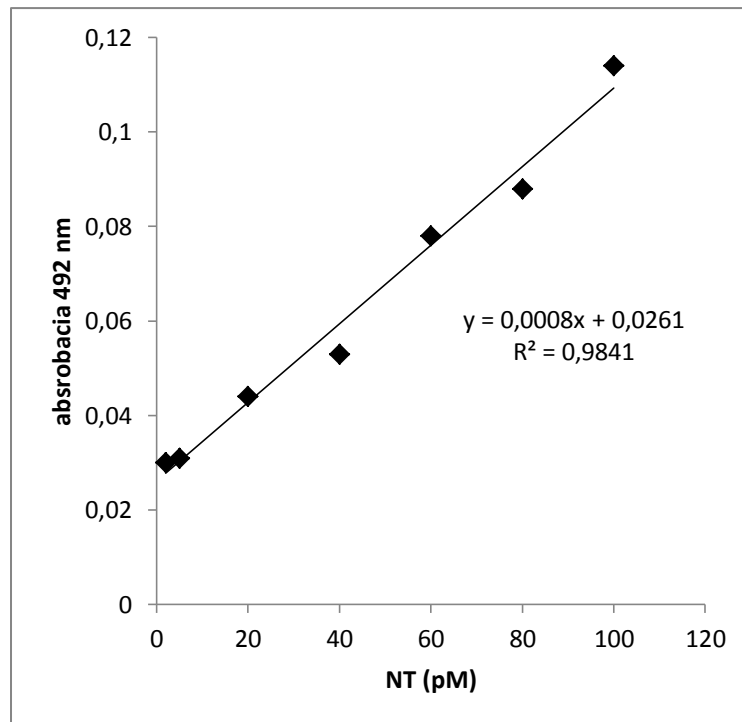


Figura 17. Curva de calibración de 3-NT por método ELISA.

Existen otros métodos de determinación de 3-NT que han mejorado la calidad analítica de detección de 3-NT en sistemas biológicos. La 3-NT en las proteínas constituye un huella dejada por las reacciones de los oxidantes derivados del  $\bullet\text{NO}$  que generalmente están asociados a estrés oxidativo, además la nitración de la proteína tirosina puede causar cambios estructurales y funcionales, que pueden ser de relevancia fisiopatológica para enfermedades humanas. La nitración de la tirosina a nivel biológico es un proceso con participación radicales libres y que implica la intermediación de radicales tirosilo; a pesar de ser un proceso no enzimático, la nitración es dirigida selectivamente hacia un subconjunto limitado de residuos de tirosina. La identificación precisa y la cuantificación de la 3-NT en las proteínas ha representado un desafío para los investigadores. Un pequeño número de proteínas son objetivos preferenciales de nitración (generalmente menos de 100 proteínas por proteoma), en contraste con la gran cantidad de proteínas modificadas por otros cambios postraduccionales como la fosforilación, acetilación y, S-nitrosación. Los enfoques proteómicos han revelado características clave de la nitración de tirosina tanto in vivo como in vitro, incluida la selectividad, la especificidad del sitio y los efectos en la estructura y función de la proteína. La identificación de proteínas que contienen 3-NT y el mapeo de residuos nitrados es un desafío, debido a la baja

abundancia de esta modificación oxidativa en muestras biológicas. Como direcciones futuras que se plantean para mejorar la detección de proteínas nitradas existen protocolos que combinan diferentes tecnologías analíticas. El uso de electroforesis bidimensional clásica con detección inmunológica de proteínas nitradas seguida de identificación de proteínas por MS/MS regular en combinación con inmunoenriquecimiento de péptidos nitrados con tirosina e identificación de péptidos nitrados mediante el protocolo experimental combinado. Un protocolo que combina múltiples reacciones de separación seguidas de espectroscopia de masa en tándem que indentifica moléculas y sectores modificados en la proteína en estudio [211, 212]. Este protocolo se denomina multiple reaction monitoring-initiated detection and sequencing (MIDAS) está surgiendo como una metodología potente para mapear y cuantificar inequívocamente las proteínas nitradas de tirosina in vivo.

En nuestro trabajo hemos usado detección con método ELISA, método del que conocemos sus limitaciones, entre ellas que es semicuantitativo por lo que tiene un porcentaje de error analítico en relación a concentración. Sin embargo, el uso del método ELISA para detección de 3-NT en proteínas cumple con la función de detectar la expresión de la nitración en condiciones biológicas asociadas a enfermedad tales como la sepsis y la lesión pulmonar aguda. Nos proponemos en como continuación de nuestro trabajo la detección de proteínas nitradas y 3-NT en pacientes en las fases iniciales de sepsis y lesión pulmonar aguda usando métodos de mayor sensibilidad y especificidad como los mencionados anteriormente-espectroscopia de masa acoplada con métodos analíticos previos que aumentan el rendimiento del método.

### **Medida de $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E)**

El  $\alpha$ -TOH (vitamina E) se midió mediante HPLC de fase inversa utilizando un equipo de HPLC Gilson. En resumen, se mezclaron 20  $\mu$ L de muestras con 180  $\mu$ L y se agitaron durante 10 s dos veces para la precipitación de proteínas y la solubilización de antioxidantes. Luego, las muestras se centrifugaron a 1000 g, 10 min a 4°C y se inyectaron 50  $\mu$ L. Los análisis de antioxidantes se realizaron en una columna Sulpecosil LC-18 (250 x 4,6 mm ID, 5 micras), fase móvil de metanol a un flujo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. El sistema de detección incluía un Detector Fluorimétrico Gilson Modelo

122 ( $\lambda_{ex} = 295$ ,  $\lambda_{em} = 330$  nm, ganancia = 100) y un Detector Gilson Modelo 155 UV / VIS (modo de longitud de onda dual,  $\lambda_1 = 266$  nm,  $\lambda_2 = 234$  nm, ganancia = 10009 para la detección simultánea de tocoferoles y  $\alpha$ -tocoferil quinona. Las concentraciones de  $\alpha$ -TOH y  $\gamma$ -TOH se calcularon frente a los estándares comerciales tal como se recibieron, al comparar las proporciones de las áreas de los picos con las curvas estándar correspondientes que tuvieron coeficientes de correlación lineal para la dependencia de la concentración  $> 0.995$  {Teissier E, 1996 #350}.

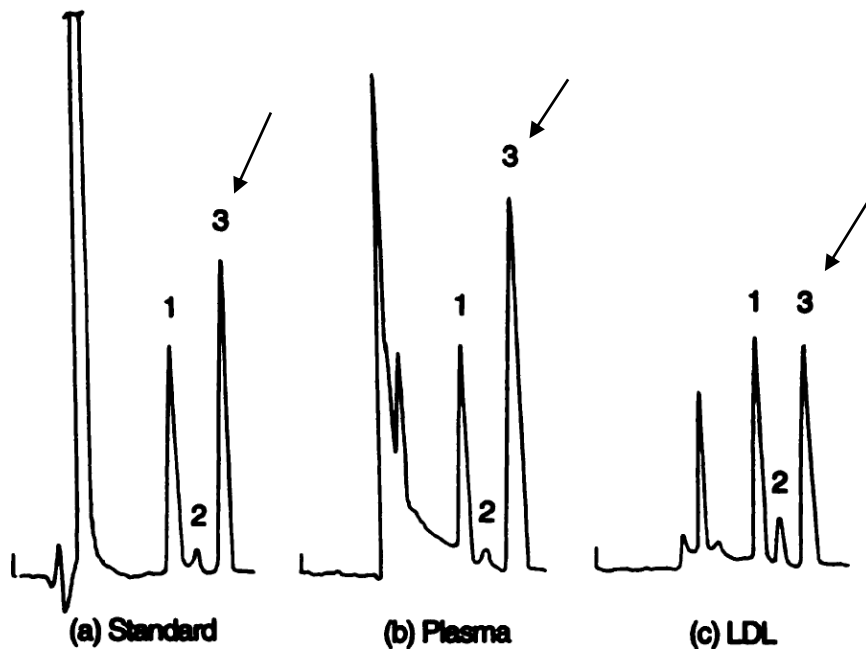


Figura 18. Cromatogramas de (a) solución de calibración, (b) plasma normal, y (c) LDL normal, todas conteniendo delta-tocoferol (estándar interno, pico 1), gamma-tocoferol (pico 2), y  $\alpha$ -tocoferol (pico 3). Tomado de Tessier E, 1996 [213]

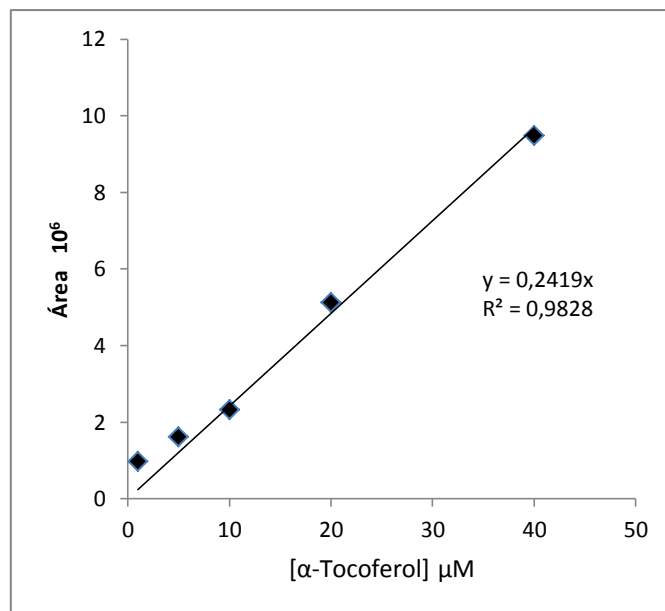


Figura 19. Curva de calibración α-TOH

## Estadística

Los valores se expresaron como medianas, percentiles 25 y 75. Las pruebas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis se utilizaron para comparar variables. Las variables categóricas se compararon con la prueba de Chi cuadrado. Después de que se obtuvieron los resultados de  $\text{NO}_x^-$  en LBA, se seleccionó el valor de corte para  $\text{NO}_x^-$  en LBA en la admisión al estudio mediante la construcción de curvas ROC para la mortalidad en la UCI. El valor de  $\text{NO}_x^-$  en LBA correspondiente a la suma de sensibilidad y especificidad más alta se eligió como punto de corte. El análisis de supervivencia se realizó transformando los valores de  $\text{NO}_x^-$  en LBA en una variable dicotómica con un valor de corte de  $\text{NO}_x^-$  en LBA mayor o igual a 53  $\mu\text{M}$ . El índice de riesgo de mortalidad en la UCI se evaluó mediante el uso de un modelo de regresión logística que incluyó variables que fueron significativas en el análisis univariado. La sobrevida se graficó con curvas de sobrevida de Kaplan Meier. Los datos fueron analizados con la versión SPSS 15.0. Una  $p < 0.05$  fue considerada significativa.

## **V.RESULTADOS**

### **Pacientes**

#### **Grupo sepsis**

Los pacientes sépticos (n=36) se incluyeron entre septiembre de 2000 y junio de 2004. El diagrama de flujo para la inclusión y la exclusión de pacientes se muestra en la figura 1. Las características de los pacientes se muestran en la tabla 1 y la tabla 2. El origen de la sepsis en el grupo sepsis fue el siguiente: peritoneal (n=13), respiratorio (n=13), endovascular (n=3), mediastínico (n=1), infección de tejidos blandos (n=1), colecistitis (n=1), absceso pancreático (n=1), entérico (n=1), urinario (n=1) y un paciente con fuente de infección desconocida (tabla 1). Las razones para la ventilación mecánica en el grupo de sepsis fueron: insuficiencia respiratoria (n=11), shock (n=9), tanto insuficiencia respiratoria como shock (n=8), disminución del nivel de conciencia (n = 4), falla multiorgánica (n=1), acidosis metabólica (n=1). El diagnóstico en el grupo de VM fue: trauma (n=21), postoperatorio (n=6), accidente cerebrovascular (n=4), hipotiroidismo (n=1), estado epiléptico (n=1). La mortalidad en la UCI fue de 44% y 18% en el grupo sepsis y en el grupo de VM, respectivamente.

#### **Grupo ventilación mecánica**

El grupo ventilación mecánica (VM) estuvo formado por pacientes incluidos entre septiembre de 2000 y junio de 2004 en VM sin sepsis y sin IPA, que fueron incluidos en las primeras 72 horas de VM. En el grupo VM los diagnósticos fueron trauma de cráneo (n =13), postoperatorio de esófago (n=1), ACV (n = 1), postoperatorio neuroquirúrgico (n=1), politraumatizados (n=4), y postoperatorio de aneurisma de aorta abdominal (n=1). La mortalidad fue 21 % en este grupo. Las variables ventilatorias fueron tomadas de las lecturas del respirador.

Tabla 1. Focos de origen de la sepsis en el grupo sepsis

	n (%)
Peritoneal	13 (36.11)
Respiratorio	13 (36.11)
Endovascular	3 (8.33)
Mediastinal	1 (2.78)
Absceso pancreático	1 (2.78)
Abdominal	1 (2.78)
Urinaria	1 (2.78)
Infección de partes blandas	1 (2.78)
Colecistitis	1 (2.78)
Foco de infección desconocido	1 (2.78)

### **Variables clínicas descriptivas al ingreso en la Unidad de Cuidado Intensivo**

Las variables clínicas al ingreso al estudio en los grupos sepsis y VM se muestran en la Tabla 2. APACHE II, MODS y LIS fueron mayores en el grupo sepsis en comparación con el grupo VM; PVC y PAR fueron más altos en el grupo sepsis que en el grupo VM mientras que el pH arterial fue menor en la grupo sepsis que en el grupo VM. La relación PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> fue menor en el grupo sepsis. La creatinina sérica, PEEP y la presión de meseta fue mayor en el grupo sepsis en comparación con el grupo VM. Se encontró que la puntuación PAR fue elevada en los no sobrevivientes en comparación con los sobrevivientes en el grupo sepsis.

La mediana de la muestra estudiada incluyendo ambos grupos, para variables clínicas y de evolución fueron, edad 53 años, APACHE 14, MODS 5, SOFA 4, LISS 1,50, estadía en UCI 18 días, días libres de ventilación mecánica 16, PAFI 366, PEEP 9 mm Hg, PAM 85 mm Hg, PVC 11 mm Hg, PAR 13, Creatininemia 0,84 mg/dL, pH 7,39, mientras que shock estuvo presente en 33%. Hubo diferencias significativas entre el grupo sepsis y el grupo ventilación mecánica, en todas las variables excepto en edad y presión arterial media (Tabla 2).



**Tabla 2. Variables clínicas**

	Todos los pacientes			Pacientes del grupo Sepsis			Pacientes del grupo ventilación mecánica (VM)			p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	p <sup>c</sup>	p <sup>d</sup>
	Todos los pacientes  (n= 69)	Sobrevivientes  (n = 47)	Fallecidos  (n = 22)	Sepsis  (n= 36)	Sobrevivientes  (n= 20)	Fallecidos  (n =16)	VM  ( n = 33)	Sobrevivientes  (n = 28)	Fallecidos  (n= 5)				
Edad (años)	53 (31-67)	48(29-63)	58(45-69)	57(40-72)	55(22-69)	62(52-74)	45(31-61)	43(30-61)	51(32-62)	NS	NS	NS	0. 027
APACHE II	14(12–19)	12(9-16)	18(12-26)	16(13-25)	15(12-18)	23(15-28)	11(9-13)	10(8-13)	12(10-18)	<0.001	0.023	NS	0.001
MODS	5.00 (2.00–6.25 )	2.00(2.00–5.00)	5.00(3.00–8.25)	5.00(3.25–7.75)	5.00(2.25 - 6.75)	7.00(5.00–9.75)	2,00(1.00-3.00)	2.00(1.00-3.00)	3,00(2.50-5.00)	<0.001	NS	NS	<0.001
SOFA	4.00(2.00–5.00 )	2.00(1.00–5.00)	5.00(2.00–7.00)	5.00(4.00–6.75)	5.00(3.25–5.00)	5.00(5.00–7.75)	1,00(1.00-2.00)	1,00(1.00-2.00)	1,50(1.00-2.75)	<0.001	NS	NS	0.001
SIP	1.50(1.00–2.00 )	1.25(0.75-1.75)	1.62(1.00-2.06)	1.87(1.50-2.25)	1.75(1.30-2.20)	2.00(1.50-2.25)	1,00(0.62-1.25)	1,00(0.50-1.25)	0,87(0,69-1.06)	<0.001	NS	NS	NS
Shock (%)	33	23	55	47	62	35	18	33	15	0.011	NS	NS	0.011
Estadía en UCI (días)	18(9–24)	16(9-24)	18(6-25)	21(14-29)	23(15-35)	19(8 - 26)	13(7-21)	13(8-21)	8(5-26)	0.005	NS	NS	NS
VFD(días)	16(8-21)	17(9-21)	15(7-22)	13(6-20)	13(6-20)	12(7 - 21)	19(11-23)	18(11-23)	22(5-23)	0.041	NS	NS	NS
PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub>	366(297-459)	383(306-500)	340(268-429)	340(278-428)	375(293-525)	297(210 - 385)	420(344-500)	400(338-500)	429(410-546)	0.001	NS	NS	NS

PEEP (cm de H <sub>2</sub> O)	9(6-11)	9(6-10)	10(5-12)	10(9-15)	10(9-16)	10(9 - 15)	8(5-10)	8(5-9)	7(5-10)	<0.001	NS	NS	NS
PAM (mm Hg)	85(80-91)	87(79-94)	82(80-90)	86(80-98)	89(81-98)	82(79-95)	84(78-90)	84(78-90)	86(79-90)	NS	NS	NS	NS
PVC (mm Hg)	11(10-14)	11(10-13)	13(10-16)	13(10-16)	12(10-14)	15(10-18)	10(9-12)	10(8-12)	12(9-13)	0.003	NS	NS	0.044
PAR	13(10-16)	11(9-13)	14(13-23)	14(12-20)	13(10-16)	19(13-24)	11(9-13)	11(8.5-12)	12(10-13)	<0.001	0.007	NS	0.001
creatininemia (mg/mL)	0.84(0.70-1.00)	0.80(0.70-1.00)	1.00(0.80-1.75)	1.00(0.77-2.20)	0.98(0.60-2.06)	1.15(0.80-2.34)	0,80(0.70-1.00)	0,80(0.70-0.90)	0,92(0.78-1.00)	0.007	NS	NS	0.025
pH arterial	7.39 (7.35-7.42)	7.40 (7.37-7.43)	7.38(7.30-7.42)	7.37(7.30-7.40)	7.37(7.34-7.40)	7.37(7.29-7.42)	7,40(7.38-7.44)	7,40(7.38-7.45)	7,40(7.34-7.47)	0.002	NS	NS	NS

<sup>a</sup>, para la comparación entre el grupo sepsis y el grupo VM; <sup>b</sup>, para la comparación entre fallecidos y sobrevivientes en el grupo sepsis; <sup>c</sup>, para la comparación entre fallecidos y sobrevivientes en el grupo VM; <sup>d</sup>, para la comparación entre el grupo fallecidos y sobrevivientes en todos los pacientes. Los valores se expresan como medianas, percentil 25<sup>th</sup> y percentil 75<sup>th</sup>. Abreviaturas y definiciones: PVC, presión venosa central central; UCI, unidad de cuidado intensivo; I y V, uso de inotrópicos y vasopresores; SIP, score de injuria pulmonar; PAM, presión arterial media ; MODS, score de disfunción orgánica múltiple; VM, ventilación mecánica; cociente de presiones arterial y venosa ajustado por frecuencia cardíaca (PAR, pressure adjusted heart rate ratio) ; SOFA, escala de evaluación secuencial de la falla orgánica; ; V<sub>T</sub>/Kg, volumen corriente ajustado por peso corporal; VFD, días libres de ventilación mecánica. Todos los pacientes incluyen los grupos sepsis y ventilación mecánica

## Evaluación del daño nitrooxidativo al pulmón lesionado

Nitrito más nitrato ( $\text{NO}_x^-$ ) son los productos finales de  $\bullet\text{NO}$  y de oxidantes derivados del  $\bullet\text{NO}$  como  $\text{ONOO}^-$  [2], que se pueden medir como marcadores sustitutos en el líquido de LBA. Encontramos concentraciones más elevadas de  $\text{NO}_x^-$  en ambos grupos de pacientes críticos (sepsis y VM) que el grupo de control sanos (GCBQ). El análisis de los pacientes ingresados en la UCI reveló que el grupo sepsis tenía niveles más altos de  $\text{NO}_x^-$  en LBA que el grupo VM, 62 (21 - 88)  $\mu\text{M}$  versus 27 (15-34)  $\mu\text{M}$  respectivamente,  $p < 0,001$ . Este resultado está en línea con el esperado aumento de producción de  $\bullet\text{NO}$  se observa durante la sepsis. Además, los niveles de  $\text{NO}_x^-$  de LBA fueron mayores en los no sobrevivientes sépticos que en los sobrevivientes, lo que subraya la asociación entre el estrés nitrooxidativo y la gravedad de la enfermedad, 80 (70 - 127)  $\mu\text{M}$  versus 31 (15 - 47)  $\mu\text{M}$ , respectivamente,  $p < 0,001$ ; Tabla 3 y Figura 4). El  $\bullet\text{NO}$  no es un potente oxidante en sí mismo, pero en presencia de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  dará lugar a  $\text{ONOO}^-$ , una de las principales causas del daño nitrooxidativo. Los radicales derivados de  $\text{ONOO}^-$ , como  $\bullet\text{NO}_2$ ,  $\bullet\text{OH}$  y radical carbonato ( $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ), pueden iniciar la peroxidación de lípidos (lipoperoxidación) y la nitración de tirosina unida a proteína y de tirosina libre. Por lo tanto, medimos la producción de MDA y de 3-NT en LBA para evaluar el daño nitrooxidativo pulmonar. En relación a la concentración de biomarcadores de estrés nitrooxidativo en de acuerdo a la presencia de LPA/SDRA, hubo diferencias significativas en la concentración de  $\text{NO}_x^-$  en LBA (tabla 4).

En relación a la concentración de biomarcadores de estrés nitrooxidativo y evolución de LPA/SDRA (según criterios de la definición de Berlin) encontramos que no hubo diferencia de acuerdo a la evolución, la concentración de biomarcadores de estrés nitrooxidativo no fue diferente en los pacientes del grupo sepsis que mejoraron, los que permanecieron igual o los que empeoraron (Mann Whitney test  $p = 0,837$ ). Al mismo tiempo la mortalidad no se asoció con la evolución de SDRA de acuerdo a la clasificación de Berlin ( $p = \text{ns}$ , chi cuadrado). La causa de muerte en el grupo sepsis asocio con diferencias en la concentración de  $\text{NO}_x^-$  en LBA. De acuerdo a lo anterior hubo diferencias entre los pacientes que sobrevivieron, los fallecidos por falla organica y los fallecidos por SDRA, 31 (15 – 44)  $\mu\text{M}$ , 72(63-90)  $\mu\text{M}$ , 80(70-438)  $\mu\text{M}$ ,

respectivamente, (Kruskal Wallis test  $p=0,002$ ). Del mismo modo hubo diferencias en la concentración de MDA en LBA entre los pacientes que sobrevivieron, los fallecidos por falla orgánica y los fallecidos por SDRA, 113 (14 – 212)  $\mu\text{M}$ , 120(10-147)  $\mu\text{M}$ , 240(230-262)  $\mu\text{M}$ , respectivamente, (Kruskal Wallis test  $p=0,008$ ) en la concentración de MDA en LBA entre los pacientes que sobrevivieron, los fallecidos por falla orgánica y los fallecidos por SDRA, 113 (14 – 212)  $\mu\text{M}$ , 120(10-147)  $\mu\text{M}$ , 240(230-262)  $\mu\text{M}$ , respectivamente, (Kruskal Wallis test  $p=0,008$ )

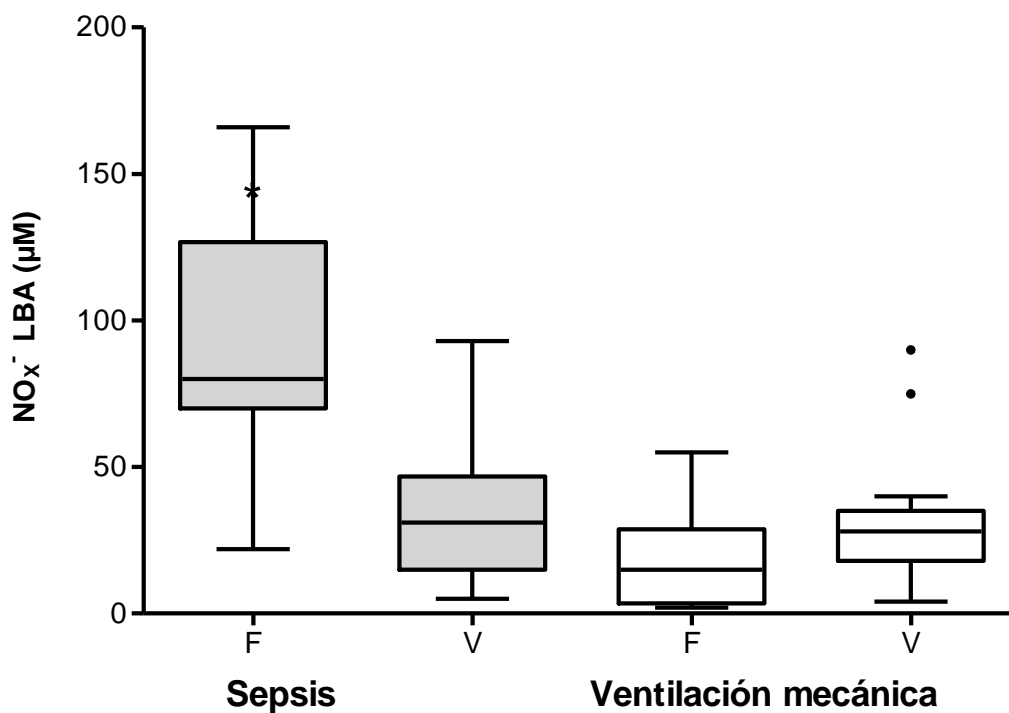


Figura 20. Producción de  $\bullet\text{NO}$ . Existen diferencias significativas en  $\bullet\text{NO}$  en LBA entre el grupo sepsis, y el grupo ventilación mecánica (VM). Grupo Sepsis, boxes rellenos; grupo ventilación mecánica boxes sin relleno. Grupo sepsis,  $n = 36$ ; grupo Ventilación mecánica,  $n = 33$ .  $p < 0,05$  grupo sepsis versus ventilación mecánica

### 3-nitrotirosina en líquido de lavado bronquioloalveolar

Ambos grupos de estudio (Sepsis y VM) mostraron evidencia de nitración de proteínas en LBA (Tabla 3). En LBA 3-NT fue mayor en el grupo sepsis que en el grupo VM. No hubo diferencia estadística entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes en ninguno de los grupos analizados (Tabla 3 y Figura 5). La 3-NT de GCBQ no fue determinada. Según referencia de literatura en individuos sanos es de 28 (26–33) pmol/mg proteína (De Andrade, 2000[215]).

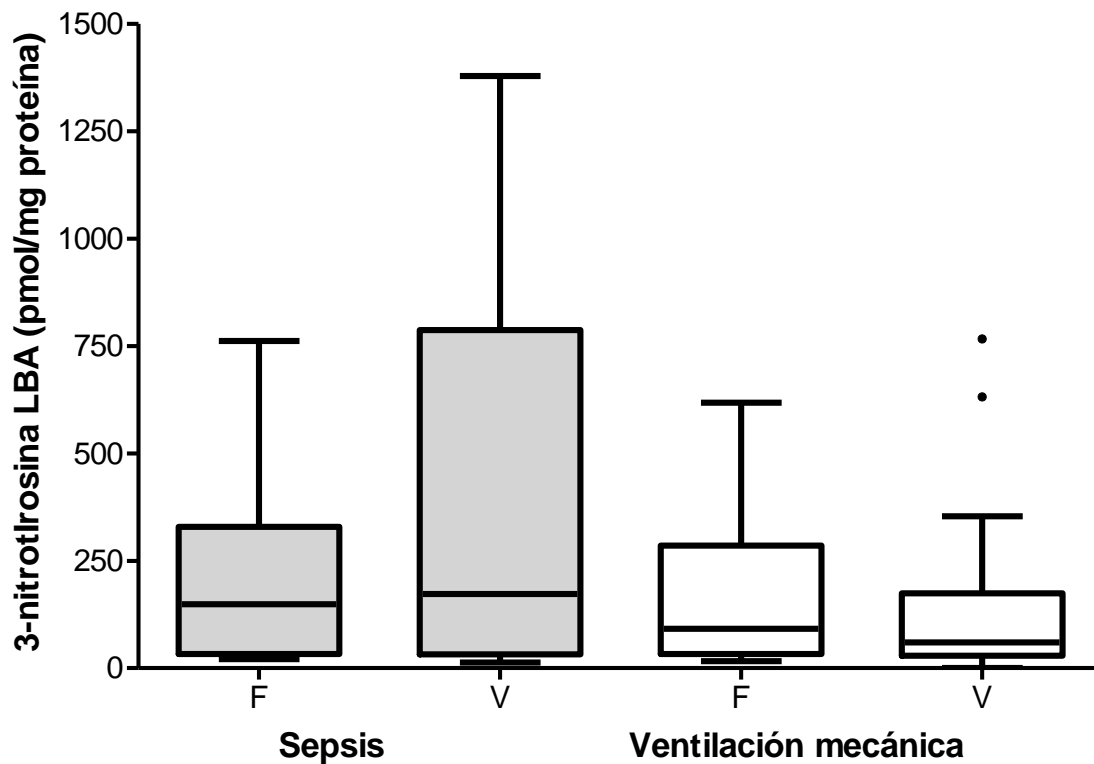


Figura 21. 3-NT en LBA. Grupo Sepsis, boxes rellenos; grupo ventilación mecánica boxes sin relleno. Grupo sepsis, n = 36; grupo Ventilación mecánica, n = 33. \*, p<0,05 grupo sepsis versus ventilación mecánica

### Malondialdehído en líquido de lavado bronquioloalveolar

El MDA en LBA se determinó en grupo sepsis y en el grupo de VM. Tanto la sepsis como el grupo VM mostraron evidencia de peroxidación lipídica (Tabla 3). MDA en

LBA fue mayor en grupo sepsis en comparación con VM. No hubo diferencia en los niveles de MDA entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes en ambos grupos (Tabla 3 y Figura 6). El MDA de LBA de GCBQ no fue determinado. Según referencia de literatura en individuos sanos es de  $6,1 \pm 0,7$  nM (Ozaras, 2000)

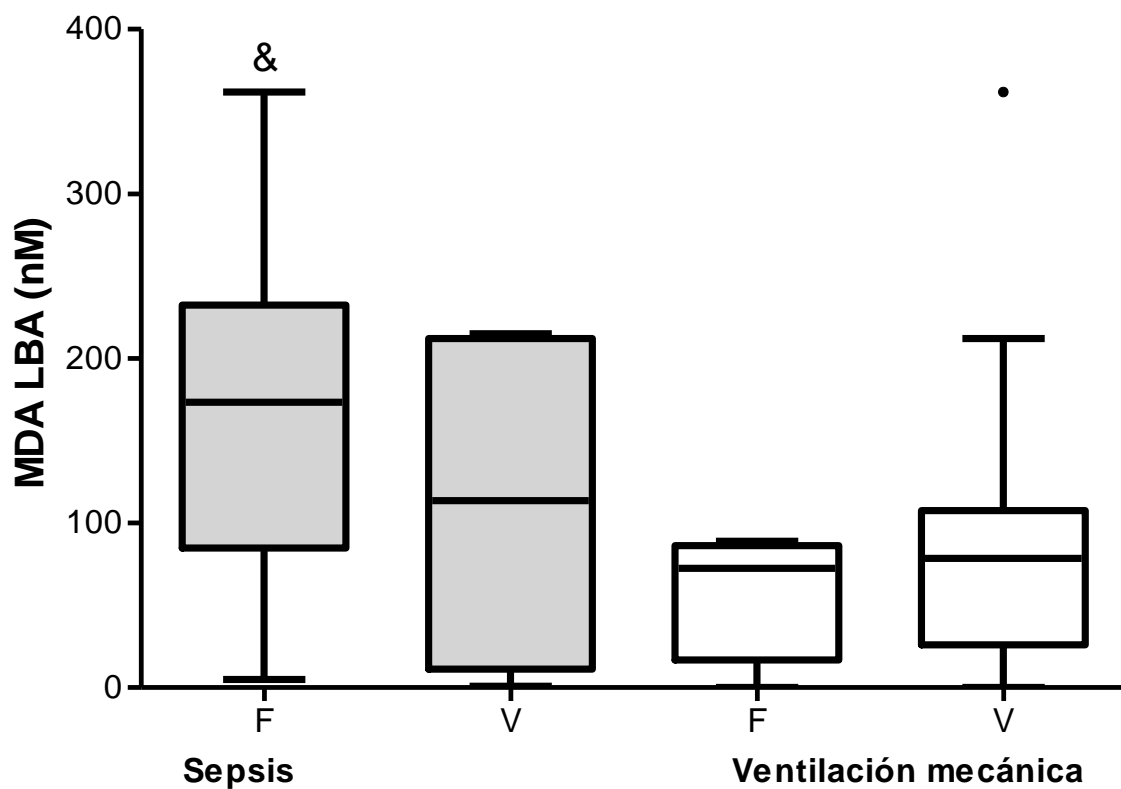


Figura 22. MDA en LBA. Grupo Sepsis, boxes rellenos; grupo ventilación mecánica boxes sin relleno. Grupo sepsis, n = 36; grupo Ventilación mecánica, n = 33. &, p<0,05 grupo sepsis versus ventilación mecánica

## Proteínas en LBA

Los grupos sepsis y VM tuvieron concentraciones de proteínas en el LBA mayores que el grupo control sano, no hubo diferencias significativas entre ambos grupos.

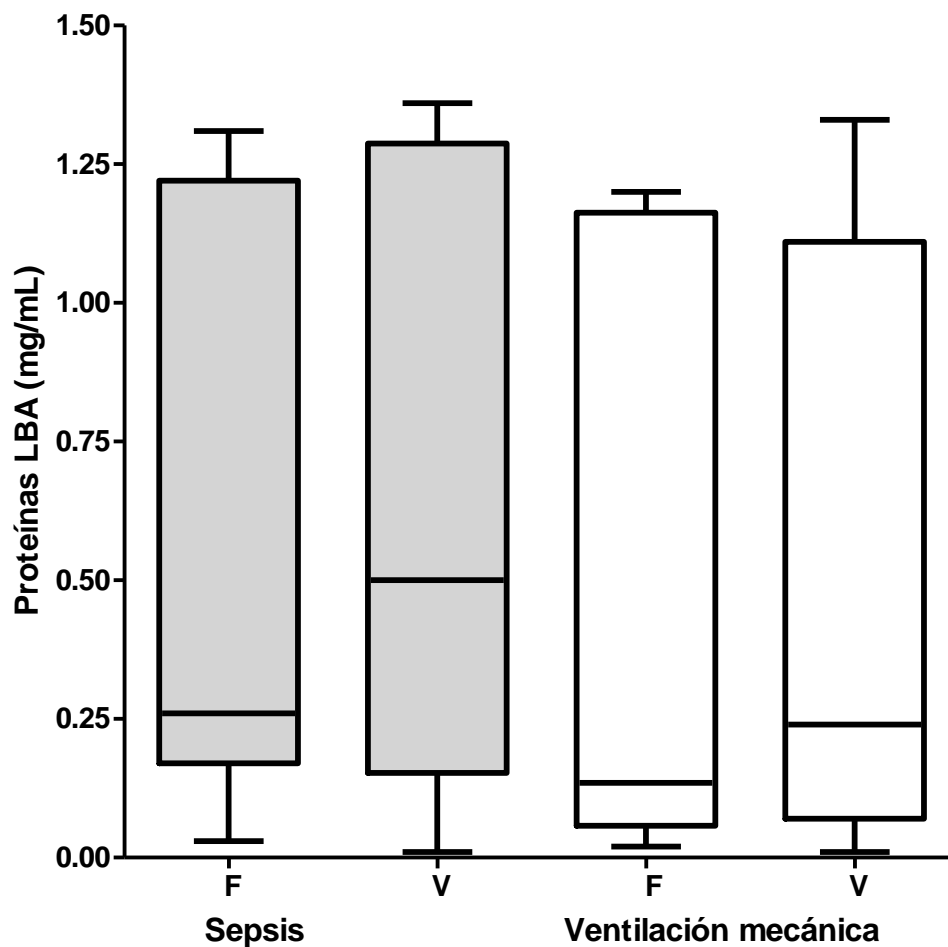


Figura 23. Proteínas en LBA. Grupo Sepsis, boxes rellenos; grupo ventilación mecánica boxes sin relleno. No hubo diferencias significativas entre los grupos.

## Nitrito y nitrato en plasma

La concentración de  $\text{NO}_2^-$  más  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_x^-$ ) en plasma se determinó en pacientes con sepsis ( $n = 36$ ), grupo VM ( $n = 24$ ) y GCBQ. Las concentraciones de  $\text{NO}_x^-$  plasma en ambos grupos, sepsis y grupo VM fueron mayores [216] cuando se compararon con

GCBQ (Tabla 3). La concentración de  $\text{NO}_x^-$  en plasma fue mayor en el grupo sepsis en comparación con VM. No hubo diferencias en la concentración de  $\text{NO}_x^-$  en plasma entre los fallecidos y los sobrevivientes en ninguno de los grupos

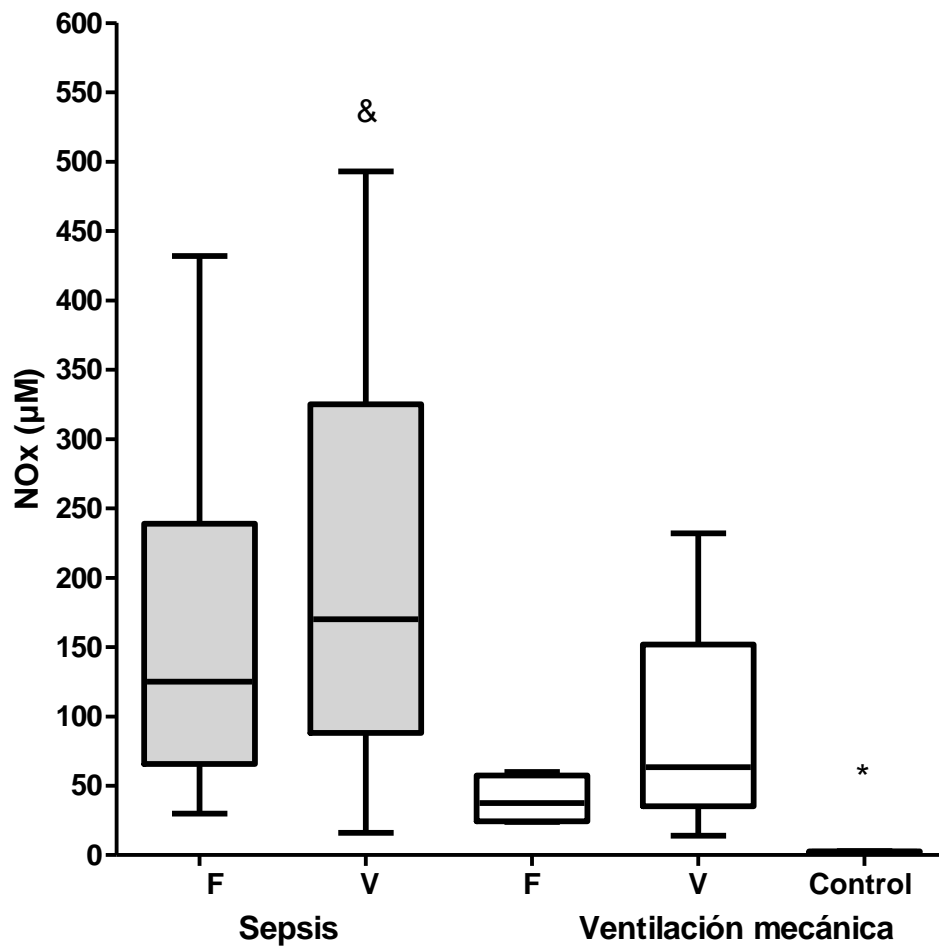


Figura 24.  $\text{NO}_x^-$  en plasma. Grupo Sepsis, boxes rellenos; grupo ventilación mecánica boxes sin relleno.  $p < 0,05$  versus sepsis y ventilación mecánica. &,  $p < 0,05$  grupo sepsis versus ventilación mecánica. \*, versus sepsis y ventilación mecánica



## Malondialdehído en plasma

El grupo sepsis tuvo mayores niveles de MDA comparado con los grupos VM y control sanos. En plasma el nivel de MDA fue mayor en el grupo sepsis y VM comparado con el grupo de controles sanos. El nivel de MDA fue mayor en el grupo sepsis con relación al grupo VM (figura 6 y tabla 3). Valores de referencia de MDA en plasma reportados son  $6,7 \pm 0,8$  nM en suero (Ozaras 2000),  $1,85 \pm 0,17$  en plasma (Jafari 2010), 0,41 a  $1,29 \mu\text{M}$  (Tsikas 2017),  $2,2 \pm 1,4 \mu\text{M}$  (Domijan 2014), 0,30 a  $1,41 \mu\text{M}$  (usando HPLC con detección fluorimétrica y similar método de preparación y derivatización, en una muestra de 619 controles sanos, Nielsen, 1997)

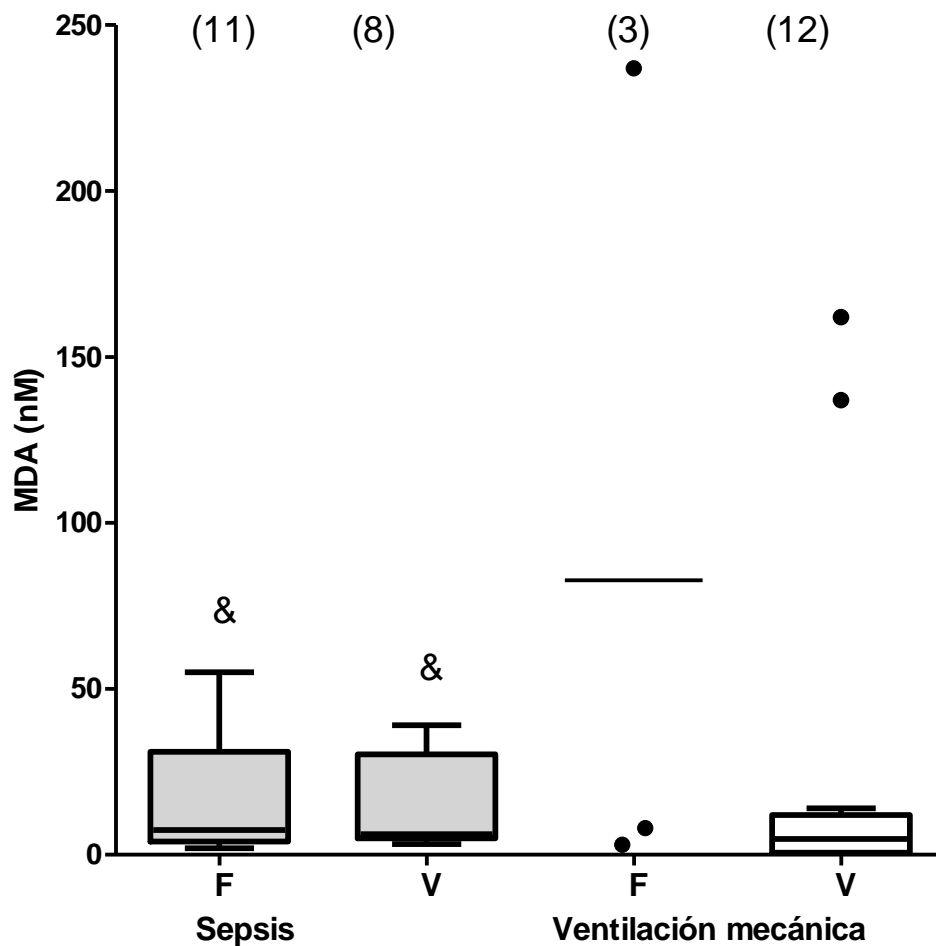


Figura 25. MDA en plasma. &,  $p < 0,05$  versus ventilación mecánica.

## $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) en plasma

Al ingreso la concentración plasmática de  $\alpha$ -TOH fue significativamente menor en el grupo sepsis en relación al grupo VM 1,50 (0,03 - 6,7)  $\mu$ M versus 6(2,0 – 7,0)  $\mu$ M. Además al ingreso, ambos grupos mostraron concentraciones por debajo de la normalidad. La concentración en plasma de referencia de  $\alpha$ -TOH en sujetos adultos sanos no fumadores reportada es  $15.4 \pm 0.73 \mu$ M (Peluffo G, 2009 [216]). En plasma se encontró mayor concentración de  $\alpha$ -TOH en los sobrevivientes en relación a los fallecidos ( $6 \pm 1.4 \mu$ M versus  $2.2 \pm 1.2 \mu$ M)

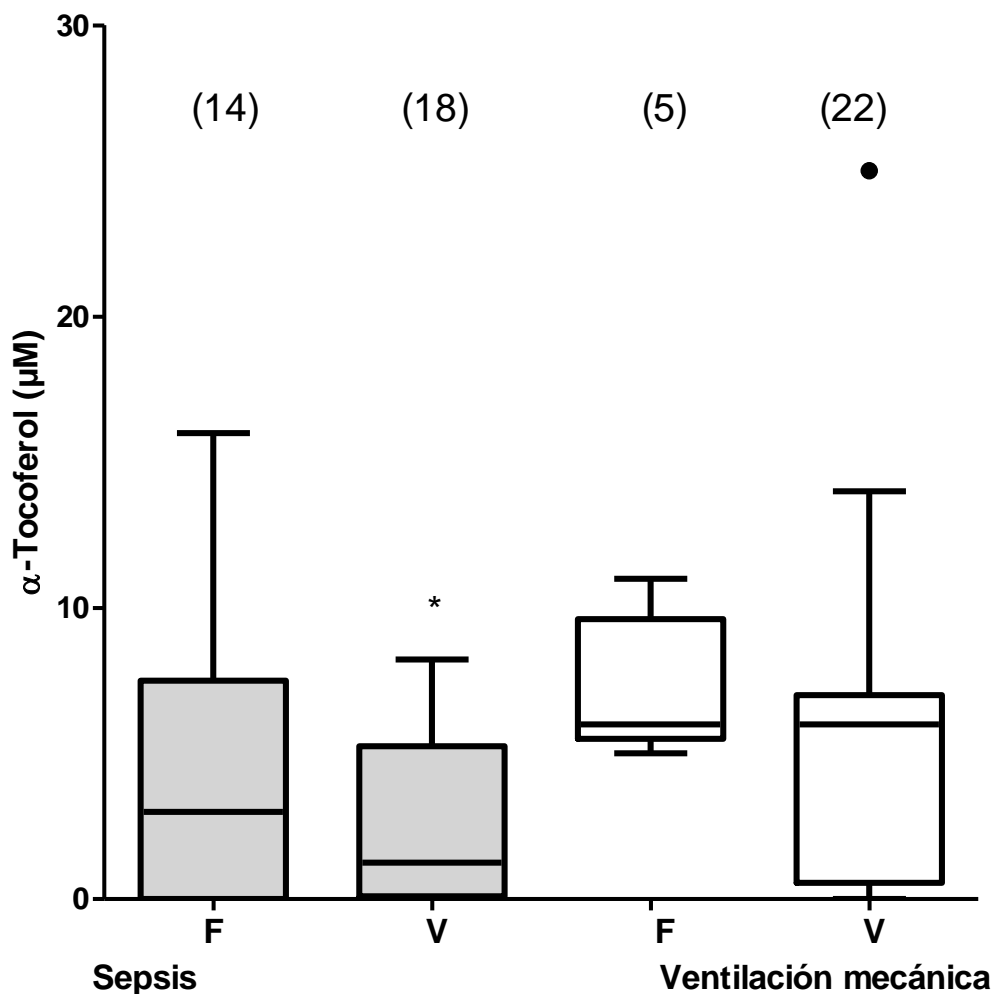


Figura 26.  $\alpha$ -TOH en plasma. \*,  $p < 0,05$  grupo sepsis versus ventilación mecánica.

**Tabla 3. Variables bioquímicas en relación a la mortalidad en UCI**

	Todos los pacientes			Sepsis			Ventilación mecánica			GCBQ
	Todos los pacientes (n = 69)	Sobrevivientes (n = 47)	Fallecidos (n = 22)	Todos los pacientes (n = 36)	Sobrevivientes (n = 20)	Fallecidos (n = 16)	Todos los pacientes (n = 33)	Sobrevivientes (n = 28)	Fallecidos (n = 5)	(n = 8)
LBA NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> ( μM)	30 (17-70)	30 (15-35)	70 (22-91) <sup>d</sup>	62 (21-88) <sup>a</sup>	31 (15-47)	80 (70-127) <sup>b</sup>	27 (15-34)	28 (18-35)	15 (4-29)	4(3- 5) <sup>e</sup>
LBA 3-NT (pmol/mg proteína)	104 (32-240)	80 (30-200)	136 (36-282)	165 (33-660) <sup>a</sup>	173 (32-787)	149 (33-329)	60 (29-175)	60 (29-174)	92 (33-286)	
LBA MDA (nM)	90 (26-191)	84 (16-138)	129 (53-208)	144 (31-212) <sup>a</sup>	114 (11-212)	174 (85-232)	78 (26-100)	79 (26-108)	73 (17-86)	
Proteínas en LBA (mg/dL)	0,3(0,1 – 1,2)	0,3(0,1-1,2)	0,4(0,1-1,2)	0,5(0,2-1,3)	0,3(0,2-1,2)	0,5(0,2-1,3)	0,2(0,1-1,2)	0,1(0,1-1,2)	0,2(0,1-1,1)	
Plasma NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> (μM)	97 (50-226)	98 (45-226)	94 (60-238)	150 (64-242) <sup>a</sup>	130 (51-240)	156 (71-250)	54 (30-119)	52 (29-145)	60 (39-74)	
MDA plasma	(n=34)	(n=14)	(n=20)	(n=19)	(n=11)	(n=8)	(n=15)	(n=3)	(n=12)	
	6(3,2 -18,3)	8(3,8-32,0)	5(3,0-14,0)	7(4,0-31,0)	8(4,0-31)	6(5,0-30)	5(2,0-14,0)	8(3 )	5(0,58-12,0)	

α-TOH plasma (μM)	(n=53)	(n=18)	(n=35)	(n=29)	(n=13)	(n=16)	(n=24)	(n=5)	(n=19)	
	4,0(0,4-7,0)	5,0(0,0-7,3)	3,5(0,5-7,0)	1,5(0,03-6,7) <sup>a</sup>	1,0(0,0-6,5)	2,0(0,31-6,9)	6,0(2,0-7,0)	6,0(5,5-9,6)	6(1,3-7,0)	

<sup>a</sup>, para la comparación entre el grupo de sepsis y el grupo de VM; <sup>b</sup>, para la comparación entre no sobrevivientes y sobrevivientes en el grupo de sepsis; <sup>c</sup>, para la comparación entre no sobrevivientes y sobrevivientes en el grupo VM; <sup>d</sup>, comparación entre no sobrevivientes y sobrevivientes en todos los pacientes; <sup>e</sup>, para la comparación con todos los grupos. α-TOH, α-tocoferol; GCBQ, grupo de control de quirófano; LBA NO<sub>x</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> más NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en lavado bronquiolo alveolar; MDA, malondialdehído; 3-NT, 3-NT; VM, grupo de ventilación mecánica. Los valores son mediana, percentiles 25 y 75. Todos los pacientes incluye el grupo sepsis y el grupo ventilación mecánica.

Tabla 4. Biomarcadores de estrés nitroxidativo de acuerdo a la presencia de LPA/SDRA

	Todos los pacientes			sepsis			VM		
		Con LPA/SDRA	Sin LPA/SDRA		Con LPA/SDRA	Sin LPA/SDRA		Con SDRA/LPA	sin SDRA/LPA
LBA									
NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> (μM)	30(17-70)	50(30-72) <sup>a</sup>	29(15-48)	62 (21-88)	70(32-78)	37(16-83)	27 (15-34)	29(22-34)	24(15-32)
3-NT (pmoles/mg prot)	104(32-240)	52(30-221)	119(38-230)	165 (33-660)	121(30-352)	180(160-762)	60 (29-175)	33(30-11)	80(29-174)
MDA(nM)	90(26-191)	120(10-223)	89(67-140)	144 (31-212)	169(47-235)	144(48-200)	78 (26-100)	0,8(0,5-40)	78 (67-100)
Proteínas (mg/mL)	0,3(0,1-1,2)	0,5(0,2-1,2)	0,2(0,1-1,2)	0,5(0,2-1,3)	0,5(0,2-1,2)	0,3(0,1-1,3)	0,2(0,1-1,2)	0,1(0,1-0,7)	0,2(0,1-0,9)
Plasma									
NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> (μM)	97(50-226)	160(53-375)	70(43-232)	150 (64-242)	200(62-288)	108(70-200)	54 (30-119)	90(38-145)	54(33-88)
MDA (nM)	6(3,2-18,3)	5(3-38)	6(4-14)	7(4,0-31)	5(3-36)	8(6-22)	5(2,0-14,0)	69(6-37)5	3(3-8)
α-TOH (μM)	4,0(0,4-7,0)	1,5(0,1-7)	5(1,2-7,0)	1,5(0,03-7,0)	1,5(0-7)	5(1,2-7)	6,0(2,0-7,0)	3,5(0-7)	6(2-7)

<sup>a</sup>, p < 0,05 versus pacientes sin LPA/SDRA en todos los pacientes. VM, ventilación mecánica. LPA/SDRA definido por Consenso de Berlín. Abreviaturas similares a leyenda de figura 3.

## Pronóstico

### Análisis de sobrevida según $\text{NO}_x^-$ en LBA

La mortalidad global en la UCI fue del 32%, mientras que la mortalidad en la UCI fue del 44% y del 18% en pacientes con sepsis y ventilación mecánica sin sepsis, respectivamente. Se realizó un análisis de supervivencia en todos los pacientes (sepsis más ventilación mecánica,  $n = 69$ ). El AUC para el análisis de ROC fue de 0,72 (IC del 95%: 0,57 a 0,87) para BALF  $\text{NO}_x^-$  (figura 11, curva ROC). En pacientes con sepsis, el AUC para el análisis de ROC fue de 0,84 (IC del 95%: 0,71 a 0,99) para los pacientes con BALF  $\text{NO}_x^-$ . Los pacientes sépticos con concentración de BALF  $\text{NO}_x^-$  igual o superior a  $53 \mu\text{M}$  tuvieron una mortalidad en la UCI de 79%, mientras que los pacientes con BALF  $\text{NO}_x^-$  menos de  $53 \mu\text{M}$  tuvieron una mortalidad en la UCI del 6% ( $p < 0,05$ ).

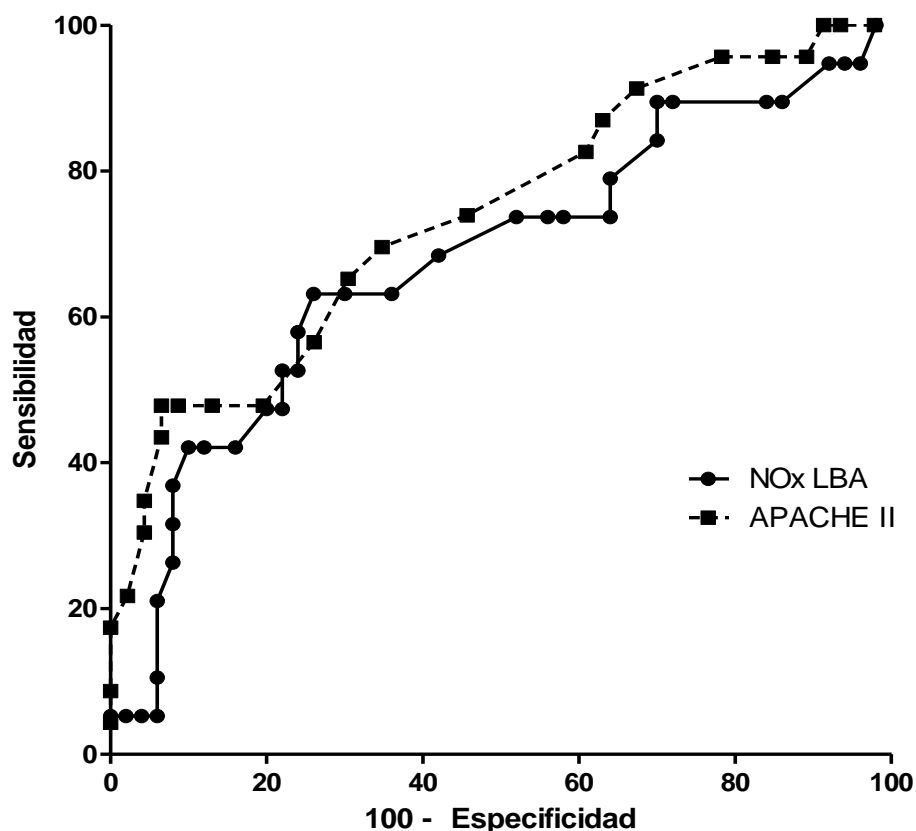


Figura 27. Curva ROC para mortalidad en UCI en la muestra total de pacientes ( $n = 69$ ).  $\text{NO}_x^-$  LBA, AUC 0,720, IC 95%(0,568 - 0,872).  $p = 0,003$ . APACHEII, AUC 0,740, IC 95%(0,608 - 0,872).  $p = 0,001$

Encontramos que a la sensibilidad de  $\text{NO}_x^-$  en LBA usando un umbral de  $53 \mu\text{M}$  en todos los pacientes, para mortalidad en la UCI fue del 73% (IC del 95%: 50% a 89%), la especificidad fue del 87 % (IC del 95%: 74% a 95%), el cociente de probabilidad positivo fue 5,6 (IC 95%: 3 a 13), el cociente de probabilidad negativa fue 0,31 (IC 95%: 0.16 a 0.62), el valor predictivo positivo fue 73% (IC 95%: 50% a 89%), el valor predictivo negativo fue del 87% (IC 95%: 74% a 95%). LR + 5,6 (esto significa que existe un moderado a gran aumento de la probabilidad de mortalidad si el test es positivo). LR - 0,31 (entre moderado y leve descenso de la probabilidad de mortalidad en UCI si el test es negativo, si  $\text{NO}_x^-$  LBA es menor de  $53 \mu\text{M}$ ) (tabla 5).

Tabla 5. Evaluación de la concentración de  $\text{NO}_x^-$  en LBA como test predictor de mortalidad en UCI.

$\text{NO}_x^-$ LBA ( $\mu\text{M}$ )	Fallecidos	Vivos		
$\geq 53$	16	6	22	VPP = VP / (VP + FP), $16 / 16 + 6 = 0,73$
$< 53$	6	41	47	VPN = VN / (VN + FN), $41 / 41 + 6 = 0,87$
	22	47	69	
	Sensibilidad = VP / (VP + FN), $16 / 16 + 6 = 0,73$	Especificidad = VN / (VN + FP), $41 / 41 + 6 = 0,87$		Exactitud = (VP + VN) / Total, $16 + 41 / 69 = 0,83$
	LR+ = $0,73 / 1 - 0,87 = 0,73 / 0,13 = 5,6$	LR - = $1 - 0,73 / 0,87 = 0,27 / 0,87 = 0,31$		

VP, verdadero positivo; VN, verdadero negativo; FP, falso positivo; FN, falso negativo; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo. El cociente de probabilidad positiva de  $\text{NO}_x^-$  LBA como test predictor de mortalidad en UCI es igual a LR + = sensibilidad / 1 – especificidad; el cociente de probabilidad negativa de  $\text{NO}_x^-$  LBA como test predictor de mortalidad en UCI es igual a LR - = 1 – sensibilidad / especificidad. Se incluye toda la muestra de pacientes analizados (grupo sepsis y grupo ventilación mecánica, n = 69)

En el análisis multivariado de regresión logística después de la corrección para APACHE II, el LBA  $\text{NO}_x^- \geq 53 \mu\text{M}$  se mantuvo como una variable pronóstica significativa (tabla 6).



Tabla 6. Regresión logística para mortalidad en CTI en todos los pacientes incluidos (n = 69)

Variable	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR (95 % C.I.)
APACHE II	0.105	0.055	3.585	1	0.058	1.11 (0.99 - 1.24)
NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> LBA	2.424	0.685	12.531	1	0.0001	11.30 (2.95 - 43.21)
Constante	-3.326	0.913	13.270	1	0.000	0.036

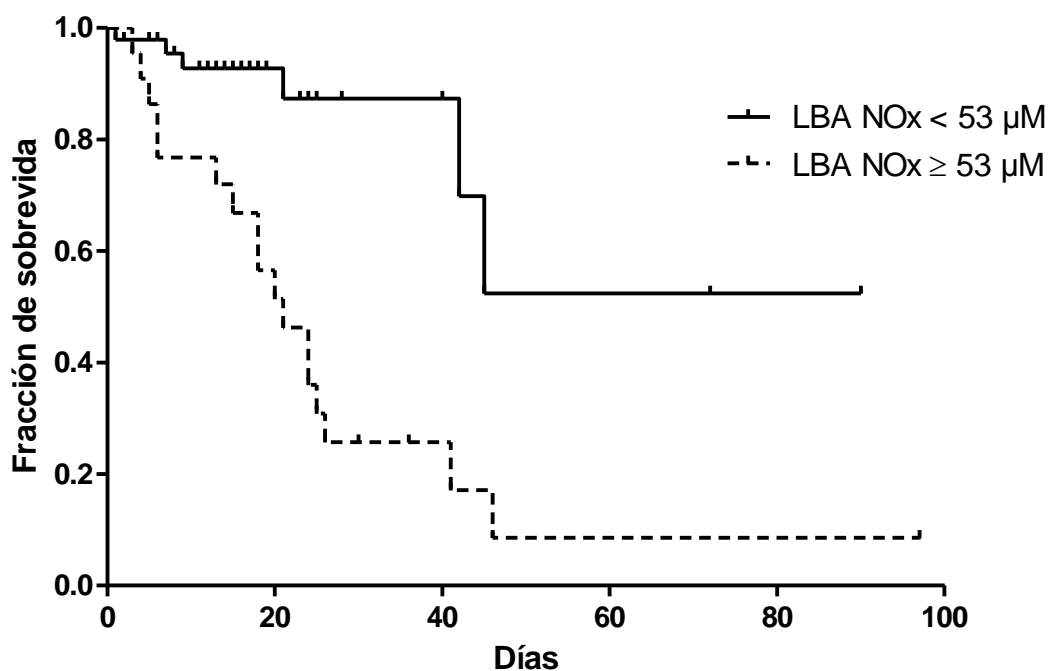


Figura 28. Supervivencia en UCI de acuerdo a NO<sub>x</sub><sup>-</sup> en LBA. Log Rank (Mantel-Cox) p < 0,001, Chi-cuadrado 12,969. NO<sub>x</sub><sup>-</sup> en LBA < 53 µM: n = 47, fallecidos n = 6, sobrevivientes n = 41 (87,2%). NO<sub>x</sub><sup>-</sup> en LBA ≥ 53 µM: n = 22, fallecidos n = 16, sobrevivientes n = 6 (27,3%). Global: n = 69, fallecidos n = 22, sobrevivientes n = 47 (68,1%)

## VI. DISCUSIÓN

En pacientes sépticos en ventilación mecánica, observamos una producción elevada de estrés nitroxidativo y una asociación entre los oxidantes derivados del  $\bullet\text{NO}$  pulmonar y la evolución de los pacientes en UCI. Encontramos que el estrés nitroxidativo comienza en etapas tempranas aún antes de que se desarrolle una lesión pulmonar grave. Además, observamos aumento temprano en la concentración de  $\text{NO}_x^-$  en LBA tanto en los pacientes que tienen una lesión pulmonar severa como en los pacientes que no tienen una lesión pulmonar severa. Los pacientes que murieron con SDRA o con insuficiencia orgánica tuvieron una concentración elevada de  $\text{NO}_x^-$  en LBA; esto se relacionó con el estímulo nitroxidativo persistente tanto en pulmón como sistémico. La inflamación y las lesiones pulmonares inducidas por la sepsis se asocian con sobreproducción de  $\bullet\text{NO}$  en un entorno proinflamatorio pulmonar, donde se espera un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno, en particular  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . La producción de  $\bullet\text{NO}$  y el estrés oxidativo se han descrito en varios modelos animales experimentales de sepsis y de LPA/SDRA [32, 75, 131, 153, 217]. En humanos, se ha reportado un aumento de la producción de  $\bullet\text{NO}$  pulmonar durante la sepsis, shock séptico y SDRA [109, 110, 146, 154, 171, 172, 175, 177, 179, 218]. Se ha propuesto un mecanismo inflamatorio y oxidativo desencadenado por citoquinas para explicar el aumento de la concentración de  $\bullet\text{NO}$  tanto pulmonar y sistémica en esos pacientes. Zhu y colaboradores informaron un aumento del  $\text{NO}_x^-$  en el líquido del edema pulmonar en 34 pacientes con LPA/SDRA (38% con sepsis) en comparación con 20 pacientes con edema pulmonar hidrostático [169, 188]. Se ha informado una elevación persistente en LBA de  $\text{NO}_x^-$  en pacientes con SDRA de múltiples orígenes en trabajos previos, en los que la concentración de LBA  $\text{NO}_x^-$  fue más alta en los fallecidos evaluados en los días 7 y 21 [172]. En nuestro estudio encontramos que el aumento de  $\text{NO}_x^-$  en el LBA ocurre temprano en pacientes sépticos ventilados independientemente de la presencia de lesión pulmonar primaria. Además observamos un valor predictivo de LBA  $\text{NO}_x^-$  en una población homogénea de pacientes sépticos.

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a nivel celular lo que causa lesión tisular u orgánica [219]. Un biomarcador es la medición de un compuesto que refleja directamente ciertos eventos biológicos relacionados con la patogenia de una enfermedad; en el caso del MDA, la oxidación de los lípidos es el evento biológico [124, 207] . Se han propuesto varias hipótesis que describen la formación de MDA in vivo [66]. Se cree que el mecanismo implica la formación de endoperóxidos de tipo prostaglandina a partir de ácidos grasos poliinsaturados con dos o más enlaces dobles o, alternativamente, a través de la formación de hidroperóxido y la escisión de ácidos grasos poliinsaturados. Existen otras fuentes menores, como los subproductos de la formación de radicales libres. El uso del ensayo de ácido tiobarbitúrico para medir la MDA puede dar resultados confusos debido a la falta de especificidad en mezclas biológicas complejas, ya que varios productos distintos del MDA pueden producir aductos con propiedades ópticas similares [220-225]. En nuestro estudio utilizamos un método basado en HPLC con detección fluorimétrica, que mejora significativamente la especificidad de la medición de MDA como se ha reportado anteriormente. La concentración elevada de MDA en LBA se ha reportado como un biomarcador de aumento de la lesión oxidativa pulmonar y de peroxidación lipídica. En nuestro estudio, encontramos que los pacientes sépticos tienen una mayor producción de MDA que el grupo VM. Ambos grupos tienen mayor concentración de LBA MDA que los controles sanos.

Dado que la ventilación mecánica puede inducir biotrauma, podríamos especular que la actividad NOS se elevaría en la sepsis y en los grupos de ventilación mecánica. El estímulo inflamatorio de la sepsis aumenta la expresión de NOS aún más, como resultado, las concentraciones de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  en el plasma y en las muestras de LBA son más altas en la sepsis que en el grupo ventilación mecánica. La expresión de NOS pulmonar junto con citoquinas inflamatorias se han descrito en los pulmones de pacientes con SDRA después de la sepsis [179].

En nuestro estudio los resultados permiten inferir que durante la sepsis y la VM existe producción elevada de  $\bullet\text{NO}$  tanto a nivel pulmonar como

sistémico. El grupo VM tuvo mayor concentración de  $\bullet\text{NO}$  que el grupo control sanos, este hecho podría explicarse por el estímulo mecánico por la VM. Con relación a la hiperproducción de  $\bullet\text{NO}$  por estímulo mecánico existen reportes experimentales en animales y en cultivos celulares que han demostrado aumento de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  y sobreexpresión de NOS de células alveolares [130].

Nuestros resultados muestran que existe estrés nitrooxidativo pulmonar dado por concentraciones elevadas de MDA y 3-NT en el LBA en el grupo sepsis. En la circulación sistémica en la sepsis y durante la VM también se demuestra la presencia de estrés nitrooxidativo dada por aumento plasmático de MDA. Es interesante destacar que estos hechos ocurren en pacientes sin injuria pulmonar severa, se podría especular como probables estímulos de producción la actividad inflamatoria por citoquinas en la sepsis y por otro lado las modificaciones inducidas por la ventilación mecánica que determinan un aumento en la liberación de mediadores inflamatorios a nivel pulmonar. El estímulo inflamatorio de origen biomecánico podría estar presente como causa principal en el grupo de pacientes ventilados sin sepsis.

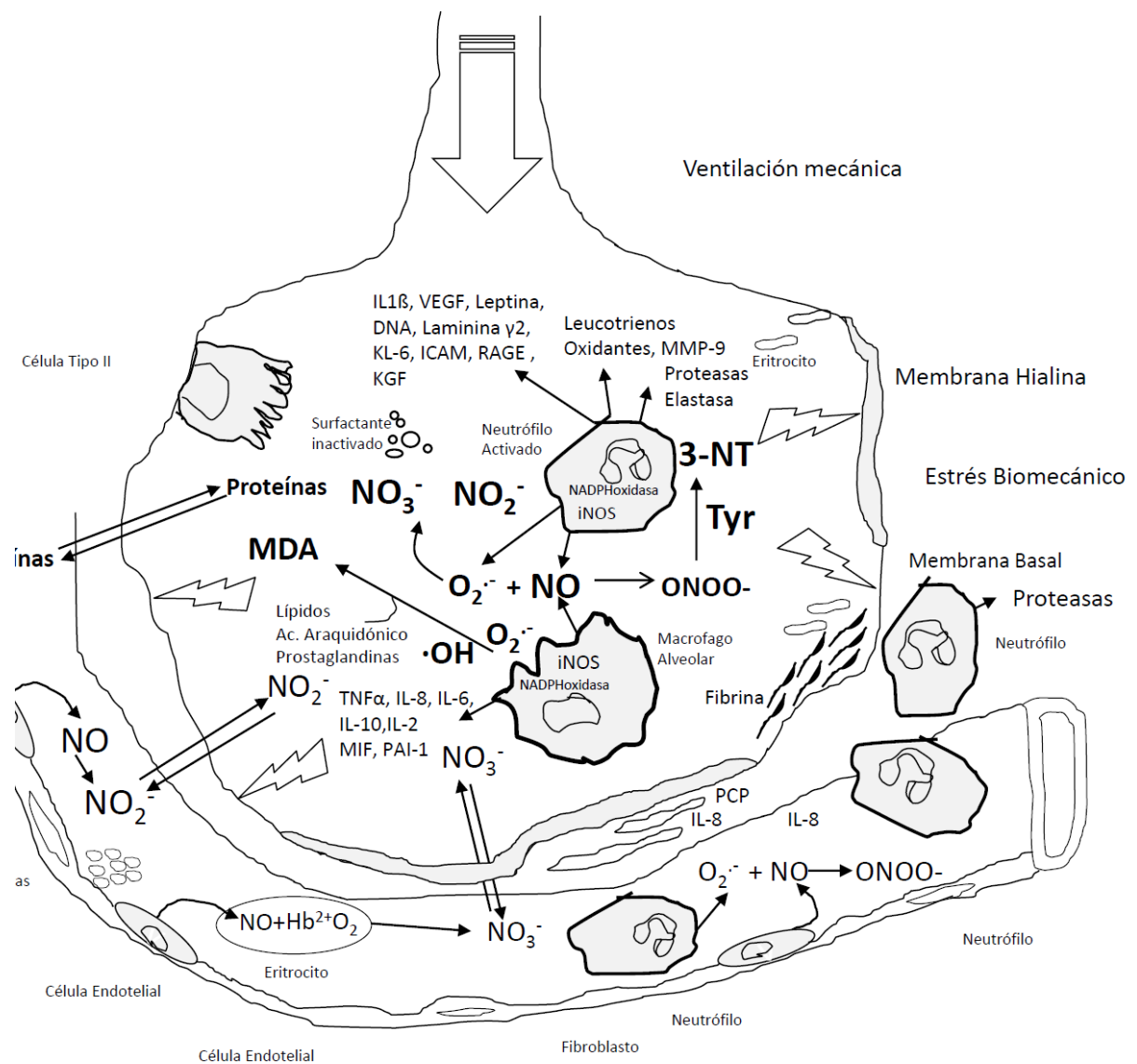


Figura 29. Rol de ERN y ERO en la producción y en los mecanismos de inflamación alveolar. Fase inicial inflamatoria y lesional en el LPA/SDRA. Respuesta inflamatoria y producción de ERN (especies reactivas del nitrógeno), ERO (especies reactivas del oxígeno), peroxinitrito (ONOO-), nitrotirosina (3-NT) y oxidantes ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$ ) y productos derivados del  $\cdot NO$  ( $NO_2^-$  y  $NO_3^-$ ). Se produce MDA (malondialdehído) por lipoperoxidación. En la fase aguda del síndrome, se desprenden las células epiteliales bronquiales y alveolares, con formación de membranas hialinas ricas en proteínas en la membrana basal denudada. Los neutrófilos son adheridos regiones lesionadas del endotelio capilar, migran a través del intersticio en el espacio aéreo, que

está ocupado por líquido de edema con alto contenido en proteínas. En el alveolo el macrófago alveolar secreta citoquinas, interleuquina-1, 6, 8 y 10, (IL-1, 6, 8 y 10) y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), que actúan localmente para estimular la quimiotaxis y activar los neutrófilos. Los macrófagos también secretan otras citoquinas, incluyendo interleuquina-1, 6 y 10. La interleuquina-1 también puede estimular la producción de matriz extracelular por los fibroblastos. Los neutrófilos pueden liberar oxidantes, proteasas, leucotrienos y otras moléculas proinflamatorias, como el factor activador de plaquetas (PAF). Una serie de mediadores antiinflamatorios también están presentes en el medio alveolar, incluido el antagonista de la interleuquina-1, el receptor soluble de factor necrosis tumoral, autoanticuerpos contra interleuquina-8 y citoquinas como la interleuquina-10 e interleuquina-11. El edema en el alvéolo lleva a la inactivación del surfactante. Abreviaturas, APC, proteína C activada; ICAM, molécula de adhesión intercelular; CC16, proteína secretora 16; KL-6, Krebs von Lungen 6; KGF, factor de crecimiento fibroblastos; MIF, factor de inhibidor de macrófagos; MMP-9, metaloproteínasa 9; MPO, mieloperoxidasa; PCP, procolágeno; PAI-1, inhibidor del plasminógeno; SP-B, surfactante B; SP-D, surfactante D; Tyr, tirosina; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial.

### **Estrés nitroxidativo pulmonar y producción de •NO pulmonar y sistémica**

Estudios anteriores han demostrado que la producción alveolar de •NO y, por lo tanto, los niveles de  $\text{NO}_x^-$  fueron más altos en el fluido pulmonar que en el plasma de pacientes con edema pulmonar. En el presente estudio, los niveles medidos de  $\text{NO}_x^-$  en pulmón fueron más bajos en LBA que en plasma. Se utilizó LBA como fuente para la determinación de  $\text{NO}_x^-$  en los pulmones, este procedimiento conduce a un factor de dilución de 100 veces. Dado que no medimos  $\text{NO}_x^-$  en otras regiones, no podemos argumentar que todo el  $\text{NO}_x^-$  medido en el LBA se produce en el pulmón. Por otro lado la producción de •NO y de oxidantes derivados en los pulmones dificultan la eliminación del edema pulmonar, los solutos inflamatorios y se acompaña de la presencia de proteínas nitradas.

El aumento de proteínas nitradas que se observa en los grupos sepsis y VM podría explicarse por nitración por  $\text{ONOO}^-$  producido por la reacción de  $\bullet\text{NO}$  con  $\text{O}_2^{\bullet-}$  o de  $\text{NO}_2^-$  con peroxidasas pulmonares. Dado que durante la sepsis observamos mayor nitración en proteínas en LBA que durante la VM, es posible que la sepsis agregue otro factor inflamatorio infeccioso adicional al estímulo mecánico para la producción de  $\bullet\text{NO}$  y de estrés nitrooxidativo, y que de la suma de ambos efectos resulte mayor nitración de proteínas a nivel alveolar. El estrés nitrooxidativo pulmonar durante la sepsis se demuestra por la producción aumentada de  $\text{NO}_x^-$ , 3-NT y MDA en el grupo séptico. Aunque también se observó algún grado de daño nitrooxidativo en el grupo VM, demostramos que el estado séptico en sí mismo es un inductor más fuerte de  $\bullet\text{NO}$  y sus subproductos, y que están asociados con el resultado del paciente. El impacto pronóstico de la producción de  $\text{NO}_x^-$  pulmonar es mayor cuando analizamos ambos grupos sepsis y VM en conjunto.

### **Concentración de proteínas y lesión pulmonar**

La concentración de proteína en el fluido de LBA fue 0,50 (0,17 – 1,28) mg/mL en la sepsis versus 0,22 (0,07 – 1,16) mg/mL en la ventilación mecánica, p no significativa. Cederfur et al informaron que la concentración de proteína en LBA en sujetos sanos fue de 0,04 mg/mL. En nuestro estudio, la concentración de proteína en LBA, tanto en la sepsis como en la ventilación mecánica fue mayor que la concentración de proteína en LBA informada en sujetos normales, lo que es consistente con la respuesta inflamatoria pulmonar en ambos grupos. Se ha informado de que la ventilación mecánica puede inducir liberación de citoquinas proinflamatorias que desencadena lesión pulmonar. Como limitación a señalar, no medimos otros marcadores proinflamatorios específicos que podrían agregar información muy importante que vincule la producción de  $\bullet\text{NO}$  con la inflamación pulmonar. Kobayashi et al informaron altos niveles de expresión de NOS y productos derivados de  $\bullet\text{NO}$  y citoquinas proinflamatorias en LBA de pacientes con SDRA después del inicio de la sepsis.

La concentración de proteínas en LBA estima clínicamente el grado de permeabilidad capilar pulmonar, y precede el edema alveolar severo. Este evento ocurre antes de las manifestaciones que se encuentran en el examen físico, las alteraciones en la mecánica pulmonar y la radiología de tórax. Encontramos aumento de proteínas en el LBA en el grupo sepsis y en el grupo VM. Este hallazgo se une al aumento de  $\bullet\text{NO}$ , y del estrés nitroxidativo pulmonar y sistémico. Por lo tanto, se podría vincular el estrés nitroxidativo y el aumento de  $\bullet\text{NO}$  con la producción de edema pulmonar. Esto se apoya en datos previos que describen aumento de ERN y ERO en la patogenia del edema pulmonar [169].

### **Estrés nitroxidativo y lesión pulmonar aguda**

La producción de  $\bullet\text{NO}$  pulmonar puede ser explicada por el grado de injuria pulmonar en los pacientes sépticos, es decir a mayor lesión pulmonar mayor producción de  $\bullet\text{NO}$ . Es posible que la concentración de  $\bullet\text{NO}$  aumente en relación con variables de ventilación mecánica tales como PEEP y la presión platillo, a mayor presión en vía aérea y mayor presión alveolar mayor estímulo para la producción de  $\bullet\text{NO}$ . De este modo, a mayor injuria pulmonar, mayor edema pulmonar y producción de proteínas alveolares, mayor producción de estrés nitroxidativo y  $\bullet\text{NO}$  pulmonar con el consiguiente deterioro de la mecánica pulmonar evidenciado por la disminución de la compliance respiratoria. Este hallazgo, se une a la evidencia experimental en células en cultivo sometidas a hipertensión mecánica y a modelos animales de ventilación mecánica con volúmenes corrientes elevados que muestran resultados similares[127, 130, 131]. Sin embargo, aun con grados menores de lesión pulmonar existe hiperproducción de  $\bullet\text{NO}$  y estrés nitroxidativo, por lo tanto las alteraciones estructurales de la mecánica pulmonar solo explicarían en parte estos hallazgos.



## Uso de $\text{NO}_x^-$ en LBA como biomarcador pronóstico

Como es esperable las disparidades en la mortalidad entre el grupo sepsis y VM se deben a insuficiencia y disfunción orgánica. Esto se expresa como mayores valores de APACHE II, MODS, SOFA, score de IPA, grado de severidad de la clasificación de Berlin y variables fisiológicas respiratorias, metabólicas y hemodinámicas alteradas. Además, el grupo sepsis tuvo mayores concentraciones de  $\text{NO}_x^-$  y MDA en LBA y de  $\text{NO}_x^-$  en plasma en relación al grupo ventilación mecánica. En relación a la mortalidad, en el grupo sepsis, se encontró un aumento en APACHE II, MODS, SOFA, score de LPA, frecuencia de shock, mayor puntuación PAR, mayores valores de PEEP, y mayor concentración de  $\text{NO}_x^-$  en LBA en los fallecidos de la UCI en relación a los sobrevivientes.

En el grupo VM no hubo diferencias significativas en la concentración de biomarcadores de estrés nitroxidativo entre sobrevivientes y fallecidos, aunque la concentración de LBA  $\text{NO}_x^-$  fue diferente con una significación de  $p=0,08$ . No se observaron diferencias en las variables fisiológicas entre sobrevivientes y fallecidos en el grupo VM.

Luego de realizar un análisis univariado, cuando analizamos variables significativas para mortalidad en UCI en un modelo multivariado que incluía LBA  $\text{NO}_x^-$  como variable dicotómica, encontramos que LBA  $\text{NO}_x^-$  se mantuvo como una variable predictiva significativa para la mortalidad en la UCI. Este hallazgo refleja un estado inflamatorio aumentado a nivel pulmonar que se produce en pacientes con sepsis en ventilación mecánica, en este caso expresado fundamentalmente por LBA  $\text{NO}_x^-$  elevada aun considerando otras variables que fueron significativas de mortalidad en UCI. No podemos dilucidar si esta es la expresión de la producción local o si es el resultado de la producción sistémica de  $\bullet\text{NO}$ . Además, no implica causalidad ya que es una expresión de biomarcador de estrés nitroxidativo pulmonar y no un agente causante por sí mismo.

La combinación de biomarcadores adicionales puede aumentar su precisión predictiva. Sin embargo, en nuestro estudio en el análisis univariable

de la mortalidad, la 3-NT en LBA, el MDA en LBA y el MDA plasmático no se asociaron con un mal pronóstico en los pacientes con sepsis en ventilación mecánica. En el análisis de ROC, usando LBA  $\text{NO}_x^-$  como variable dicotómica con un umbral de 53  $\mu\text{M}$  se obtuvo un área bajo la curva de mortalidad de 0,82, mientras que 3-NT, MDA y  $\text{NO}_x^-$  en plasma se encontraban cerca del umbral de probabilidad por azar (área de 0,45). Por lo tanto, solo incluimos LBA  $\text{NO}_x^-$  junto con la puntuación APACHE II en el análisis de regresión logística. Como señalamos anteriormente, esto probablemente se deba al pequeño tamaño de la muestra de este estudio piloto. Desde un punto de vista fisiopatológico, se espera que el estrés nitroxidativo se asocie con un aumento de 3-NT (nitricación de proteínas) y MDA (lipoperoxidación) y que sean la expresión de lesión pulmonar y mal pronóstico. Por otro lado, sería posible tener un error de tipo I debido al pequeño tamaño de la muestra. Para confirmar que la combinación de biomarcadores puede aumentar la precisión predictiva, necesitaremos una muestra de población calculada para cada biomarcador para evitar errores. Agregamos en la conclusión de que la asociación de  $\text{NO}_x^-$  y la mortalidad se deben analizar en una muestra de población más grande, teniendo en cuenta las diferentes variables predictivas y las covariables relacionadas. Los problemas en relación al tamaño de la muestra cuando se plantean estudios de test diagnósticos han sido reportados en la literatura[226-230]. Considerando una prevalencia de mortalidad de 32%, sensibilidad de 73%, especificidad de 87%, se requieren 269 y 70 pacientes para estimar sensibilidad y especificidad.

### **Disminución de defensas antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol)**

En relación a  $\alpha$ -TOH (vitamina E) ambos grupos de pacientes tuvieron concentraciones por debajo de la normalidad al ingreso del estudio indicando consumo de defensas antioxidantes al ingreso al estudio. Dado que la concentración de  $\alpha$ -TOH (vitamina E) fue significativamente menor en sepsis en relación al grupo VM, podría concluirse que estrés nitroxidativo es mayor en sepsis en relación a VM. Aunque pueden existir otras causas de disminución de  $\alpha$ -TOH (vitamina E) de origen multifactorial en pacientes críticos con o sin sepsis. Es conocido que la VM por activación de mediadores inflamatorios

estimula enzimas que producen ERO como la NADPH oxidasa y xantino oxidasa induciendo estrés nitrooxidativo [231]. Por otro lado, se ha descrito la activación de xantino oxidasa en sepsis [232-234]. En pacientes con SDRA se evidenció deficiencia de vitamina E. El sistema antioxidante está severamente comprometido en SDRA, lo que se evidencia por la disminución de niveles de  $\alpha$ -TOH, ascorbato y selenio en plasma, junto con aumento de MDA [88, 235-239]. Se encontró una correlación significativa entre  $\alpha$ -TOH e interleuquina 8, estos hallazgos sugieren que IL-8 activa neutrófilos que producen ERO que reaccionan con vitamina E disminuyendo su concentración en plasma [238]. La administración temprana de  $\alpha$ -TOH y ácido ascórbico reduce la incidencia de falla orgánica y acorta la estadía en UCI de pacientes críticos [240]. En nuestro estudio los pacientes con sepsis probablemente tuvieron activación de la enzima xantino oxidasa y la enzima NADPH oxidasa que determinaron producción de estrés nitrooxidativo en plasma con consumo de vitamina E por reacción con ERO y ERN.

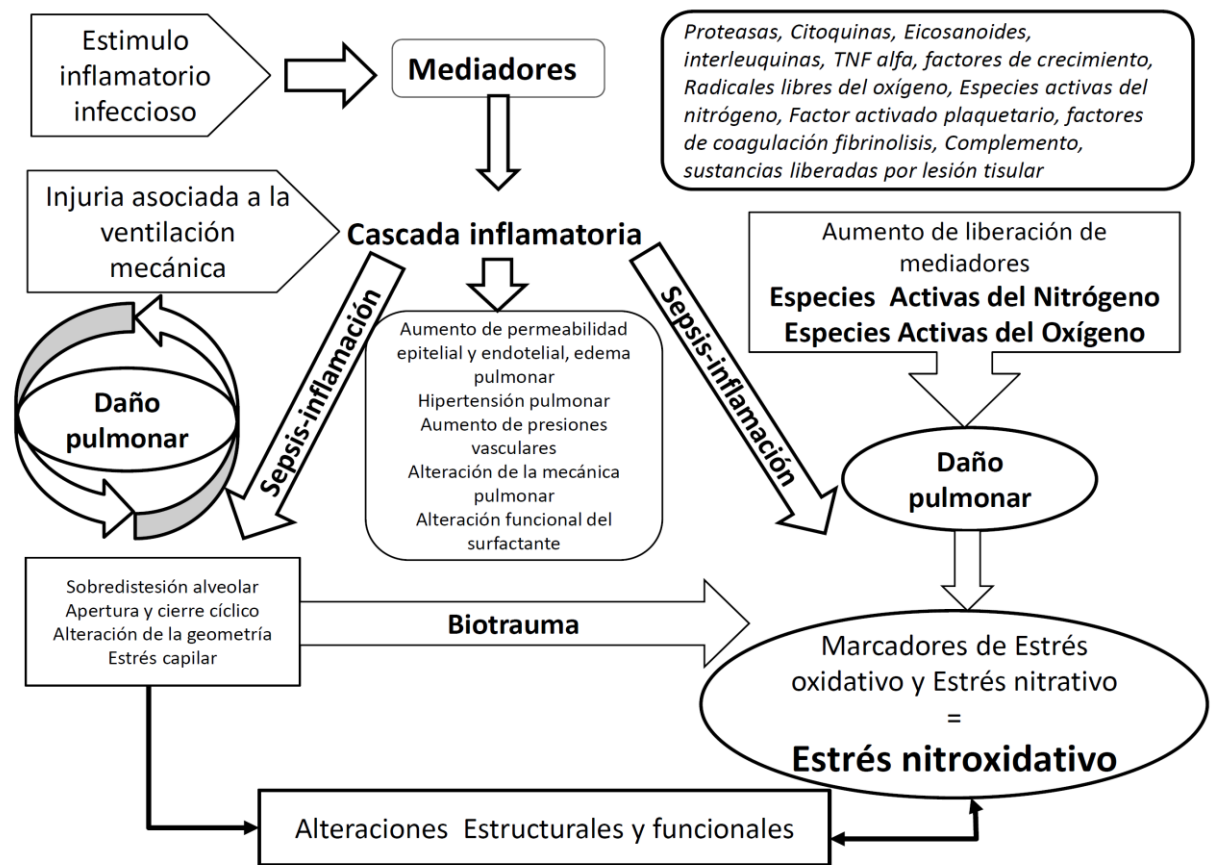


Figura 30. El estímulo infeccioso e inflamatorio provoca la liberación activación de mediadores, a esto se suma el efecto de la ventilación mecánica generando estrés biomecánico y químico por hiperoxia (lesión pulmonar asociada a ventilación mecánica). Esto aumenta el estímulo inflamatorio a través de una cascada de inflamación autoperpetuables. Los mecanismos inflamatorios de la sepsis agregados a este modelo provocan alteraciones fisiológicas y estructurales en el pulmón. La inflamación pulmonar generada por sepsis y por biotrauma provoca mecanismos que son modificables por medidas terapéuticas y por la evolución de la enfermedad. Entre los biomedadores de estos mecanismos se encuentran ERO y ERN que son liberadas por células inflamatorias que inducen por medio de reacciones bioquímicas modificaciones funcionales y estructurales. Su detección en líquidos biológicos, sangre y pulmón, es la evidencia de su participación en la lesión pulmonar por sepsis y ventilación mecánica en sus eventos iniciales.

## Limitaciones

Este trabajo tiene limitaciones que debemos analizar. En primer lugar, el análisis diferido después del tiempo de muestreo en relación con el análisis de 3-NT podría inducir dificultades analíticas. Por lo tanto, las muestras biológicas se congelaron después de la recolección y se analizaron rápidamente. Por lo tanto, los datos reales se obtuvieron justo después de la recolección de la muestra. La unión de la proteína covalente a la 3-NT es estable después de la recolección de la muestra. Se han revisado los métodos analíticos para la detección de 3-NT en muestras biológicas. Utilizamos un análisis inmunoquímico para 3-NT que podría ser semicuantitativo; este método ha sido validado por nuestro grupo. Dado que utilizamos el mismo método para ambos grupos, no hubo sesgo analítico. Podríamos especular que los valores absolutos de 3-NT pueden ser diferentes con otro método, por ejemplo, basado en espectrometría de masas. Este ítem analítico bioquímico no se discute en este documento, pero reconocemos que todavía es un tema de debate, recientemente revisado por nuestro grupo. Segundo, no se midió la 3-NT y el MDA en LBA de GCBQ. Ozaras et al informaron que la concentración de MDA en LBA es 6 nanomolar en sujetos sanos medidos con el método de Richard et al. Jafari et al utilizaron el método de Ohkawa y encontraron una concentración de  $0,63 \pm 0,067$  nmol/mg de proteína de MDA en LBA de sujetos sanos. Por otra parte, De Andrade y cols. Informaron que la concentración de 3-NT en proteínas en LBA de sujetos sanos es 28 (26 - 33) pmol/mg de proteína. Como resultado, en nuestro estudio encontramos niveles más altos de 3-NT y MDA en LBA que los valores normales informados en otros estudios. Encontramos que la concentración de  $\text{NO}_x^-$  era mayor que en estudios anteriores. Esto podría deberse en parte al método utilizado para analizar  $\text{NO}_x^-$  en LBA que utiliza la reducción química de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , lo que aumenta la sensibilidad del método de Griess. Los valores de  $\text{NO}_x^-$  encontrados en el GCBQ son similares a los informados previamente en sujetos control donde se espera que la formación de  $\text{ONOO}^-$  sea baja. En tercer lugar, el presente estudio clínico se realizó en la UCI; el papel del  $\text{NO}_x^-$  en las primeras etapas de la sepsis antes de la admisión merece una investigación más a fondo. Dado que no medimos biomarcadores de lesión pulmonar, no podemos asumir que el estrés

nitroxidativo pulmonar esté asociado con lesión pulmonar. En cuarto lugar, de manera similar, la contribución de la mieloperoxidasa derivada de neutrófilos en la nitración de tirosina en proteínas pulmonares debe estudiarse en un trabajo futuro. Utilizamos el método ELISA para la determinación de 3-NT, un método con baja especificidad debido a otros mecanismos en lugar del  $\text{ONOO}^-$  que generan nitración de proteínas. Consideramos que nuestros resultados son preliminares y generadores de hipótesis. En relación a los hallazgos con respecto a sensibilidad y especificidad de  $\text{NO}_x^-$  en LBA como test diagnóstico, se debe tener en cuenta que es necesaria una muestra con número mayor. De acuerdo a Flahault y cols. si consideramos una sensibilidad de 73% con un mínimo aceptable de 60% se requerirían 107 pacientes sépticos y 85 pacientes controles para evaluar una especificidad de 87% con un mínimo de 70% de especificidad [241]. Finalmente, este estudio piloto no es un estudio poblacional de tamaño de muestra grande y no se pueden descartar factores de confusión que contribuyen a la mortalidad, en donde la producción de  $\bullet\text{NO}$  y el estrés oxidativo podría no ser evidente.

## **Aplicaciones**

El estrés nitroxidativo en la sepsis sugiere que el  $\bullet\text{NO}$ , oxidantes derivados del  $\bullet\text{NO}$ , la formación de 3-NT y las citoquinas proinflamatorias podrían desempeñar un papel fundamental en la patogénesis de la lesión pulmonar aguda y en consecuencia ser útiles para monitorear la insuficiencia orgánica relacionada con la sepsis. Si el valor predictivo del estrés nitroxidativo pulmonar se confirma en estudios con mayor número de pacientes, su uso puede ser útil en fases muy tempranas de la sepsis para evaluar el pronóstico. Estos biomarcadores también tendrían el potencial de guiar el manejo de la ventilación mecánica, podrían usarse para evaluar la lesión pulmonar inducida por el ventilador y para guiar el manejo del ventilador con el fin de minimizar la tensión mecánica pulmonar.

## VII. CONCLUSIONES

Resumiendo, el conjunto de nuestros hallazgos permite dar una base firme a la hipótesis del daño nitroxidativo pulmonar y sistémico en pacientes con sepsis. Además, hemos comprobando que la VM induce estrés nitroxidativo pulmonar y sistémico. Nuestros hallazgos respaldan la conclusión de que la producción de  $\bullet\text{NO}$  pulmonar y los oxidantes derivados de  $\bullet\text{NO}$  se elevan muy pronto antes de que se desarrolle lesión grave pulmonar en la sepsis y en pacientes con ventilación mecánica sin sepsis. La producción temprana de  $\bullet\text{NO}$  se asocia con la evolución en UCI en pacientes con sepsis que recibieron ventilación mecánica, lo que confirmaría el efecto deletéreo fisiológico del estrés nitroxidativo en el parénquima pulmonar. En ambos procesos participa el  $\bullet\text{NO}$  de manera importante, regulando o contribuyendo al daño tisular. Estos eventos bioquímicos y moleculares tienen traducción clínica en la evolución de los pacientes, y modifican o son modificados por variables respiratorias. Podemos afirmar teniendo en cuenta nuestros resultados que  $\bullet\text{NO}$ , MDA, 3-NT, y  $\alpha\text{-TOH}$  son biomarcadores de estrés nitroxidativo y de la evolución en pacientes en ventilación mecánica sépticos y no sépticos. Los hechos que reportamos justifican la investigación de terapias antioxidantes o de modulación del metabolismo nitroxidativo en este grupo de pacientes. Además, se justifica la investigación adicional sobre el estrés nitroxidativo pulmonar durante las primeras etapas de la sepsis humana antes del desarrollo de la falla orgánica múltiple.

## VIII. RESUMENES PRESENTADOS EN JORNADAS Y CONGRESOS

Estrés nitrooxidativo en el lavado bronquiolo alveolar de pacientes con trauma grave. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Gorrasi J, Peluffo G, Batthyany C, Botti H, Naviliat M, Barrios E, Correa H, Radi R. 22º Congreso Argentino de Terapia Intensiva, 22 al 25 setiembre, Rosario, Argentina. Presentación oral. 2012. Publicado en revista Medicina Intensiva, volumen 29 número 3, 2012.

Estres nitrooxidativo en el lavado bronquiolo alveolar de pacientes con trauma grave. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Gorrasi J, Botti H, Batthyany C, Peluffo G, Naviliat M, Barrios E, Correa H, Radi R. XII Congreso de Medicina Intensiva Uruguayo, Noviembre 4 -7, 2011. Montevideo, Uruguay. Publicado en Paciente Crítico, Noviembre 2011. Vol 19, Nro 1.

Óxido nítrico pulmonar como factor pronóstico de mortalidad y de estadía hospitalaria en pacientes sépticos en ventilación mecánica. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Gorrasi J, Botti H, Bathyanny C, Peluffo G, Naviliat M, Barrios E, Correa H, Radi R. XI Congreso Uruguayo de Medicina Intensiva. 7 al 10 de noviembre, 2009, Montevideo, Uruguay. Publicado en Paciente Crítico 2009; 20(1): 37.

3-nitrotyrosine evolution in patients on mechanical ventilation compared to septic mechanically-ventilated patients. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Jose Gorrasi, Horacio Botti,



Carlos Batthyany, Mercedes Naviliat, Mario Cancela, Rafael Radi. European Society of Intensive Care Medicine 21<sup>st</sup> Annual Congress, 21-24 September 2008, Lisbon, Portugal. Intensive Care Med; 2008: 34 (Suppl 1) A185..

Lung nitroxidative stress as a prognostic factor in ventilated septic patients. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Gorrasi J, Botti H, Batthyany C, Naviliat M, Cancela M, Radi R. 27th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine. 27 – 30 March 2007, Brussels, Belgium. Critical Care, 2007 ,11 (suppl 2): P 453. March 2007 Vol 11 Suppl 2.

Early pulmonary nitrooxidative stress production has predictive value for mortality in septic patients. J. A. Gorrasi, H. Botti, C. Batthyany, M. Naviliat, M. Cancela, R. Radi. 20th ESICM Annual Congress – Berlin, Germany – 7–10 October 2007. Intensive Care Med; 2007: 33 (Suppl 2) A 0464.

Lung nitroxidative stress as a prognostic factor in mechanically-ventilated septic patients. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Gorrasi J, Botti H, Batthyany C, Naviliat M, Cancela M, Radi R. 7th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis (TSIS), March 13-17, 2007, Munich, Germany. Inflamm. Res, Supplement 2 (2007): S212.

Alveolar Protein Nitration Induced by Sepsis and by Mechanical Ventilation in the Evolution of Critically Ill Patients. Cátedra de Medicina Intensiva,

UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Gorrasi J, Botti H, Batthyany C, Naviliat M, Correa H, Radi R. American Thoracic Society annual Conference. 2005, San Diego, USA. Poster Discussion Session. ATS Conference Abstracts 2005, Abstract D95 (abstract page A 916).

La ventilación mecánica y la sepsis inducen nitración de proteínas alveolares en la evolución de los pacientes críticos. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Gorrasi J, Batthyany C, Botti H, Naviliat M, Correa H, y Radi R. Facultad de Medicina. UDELAR. Montevideo. Uruguay.

Presentacion Oral (Sesión Terapia Intensiva y ARM ) en el IV CONGRESO DE LA ASOCIACION LATINOAMERICANA DE TORAX (ALAT). 32° CONGRESO DE LA ASOCIACION ARGENTINA DE MEDICINA RESPIRATORIA (AAMR) 9-12 Octubre 2004, Buenos Aires, Argentina. Publicado en Arch Bronchoneumol 2004; 40 (Suppl4):1-38.

Biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con sepsis y en pacientes en ventilación mecánica. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Gorrasi J, Batthyany C, Botti H, Naviliat M, Cancela M, Correa H, Radi R. Medicina Intensiva. Vol 21, Suplemento 1, año 2004, pag 131. 15o Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Terapia Intensiva. 25 al 28 de setiembre 2004. Buenos Aires, Argentina.

Systemic and pulmonary oxidative stress biomarkers in sepsis and mechanical-ventilation induced lung injury. Cátedra de Medicina Intensiva,

UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Gorrasi J, Batthyany C, Botti H, Correa H, Radi R. Free Radical Biology and Medicine. Vol 36, Supplement 1, 2004.S93. 12th Society for Free Radical Research International Meeting. Mayo, 2004. Buenos Aires, Argentina.

Estrés oxidativo y nitrativo pulmonar durante la sepsis. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Gorrasi J, Fariña G, Severo L, Batthyany C, Naviliat M, Correa H, Radi R. PAC CRITICO 2003; 16(1): 40-41. IX Congreso Uruguayo de Medicina Intensiva. 21 al 24 octubre 2003, Montevideo, Uruguay.

Lung and systemic oxidative and nitrate stress in septic and mechanically-ventilated patients. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Gorrasi J, Fariña G, Severo L, Batthyany C, Naviliat M, Correa H, Radi R. Am J Resp Crit Care Med 2003; 167 (7): A 775. 99th International Conference, May 16-21, 2003 , Seattle, Washington, American Thoracic Society.

Estrés oxidativo y nitrativo a nivel pulmonar en la sepsis. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Gorrasi J, Fariña G, Severo L, Batthyany C, Naviliat M, Correa H, Radi R. XI Congreso Uruguayo Médico Quirúrgico de Emergencia. 18-22 setiembre 2002, Montevideo, Uruguay.

Estrés oxidativo y nitrativo a nivel pulmonary en la sepsis. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Gorrasi J, Fariña G, Severo L, Batthyany C, Naviliat M, Correa H, Radi R. III Congreso ALAT. 11-14 diciembre de 2002. Punta del Este, Uruguay

Lung and systemic nitric oxide overproduction in septic and mechanically-ventilated patients. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Gorrasi J, Fariña G, Severo L, Pittini G, Correa H, Radi R. Am J Resp Crit Care Med 2002; 165 (8): A701. 98th International Conference of the American Thoracic Society, May 17-22, 2002, Atlanta, Georgia .

Niveles elevados de óxido nítrico en pacientes sépticos y en pacientes en ventilación mecánica. Cátedra de Medicina Intensiva, UDELAR. Cátedra de Bioquímica, UDELAR. Gorrasi J, Fariña G, Severo L, Pittini G, Correa H, Radi R. PAC CRITICO 2001; 14(2): 79-80. VIII Congreso Uruguayo de Medicina Intensiva. 3 al 5 de octubre, 2001, Montevideo, Uruguay

## **IX. ARTICULO COMPLETO**

Lung nitroxidative stress in mechanically-ventilated septic patients: A pilot study. Gorrasi J, Peluffo G, Botti H, Batthyany C, Naviliat M, Barrios E, Correa H, Radi R. J Crit Care. 2019 Feb 20;51:204-212. doi: 10.1016/j.jcrc.2019.02.017. [Epub ahead of print]. Volume 51, June 2019: Pages 204-212

## REFERENCIAS

- [1] Correa H. Sepsis, disfunción orgánica múltiple y shock: aspectos clínicos. . In: Sepsis y falla multiorgánica Castro J, Hernandez G 2 edición, Santiago de Chile, Publicaciones Técnicas Mediterráneo 1999:47-62.
- [2] McNicholas BA, Rooney GM, Laffey JG. Lessons to learn from epidemiologic studies in ARDS. *Curr Opin Crit Care* 2018;24(1):41-8.
- [3] Partrick D, Moore F, Moore E, et al. Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *New Horizons* 1996;4 (2):194-210.
- [4] Hoegl S, Zwissler B, Eltzschig HK, Vohwinkel C. Acute respiratory distress syndrome following cardiovascular surgery: current concepts and novel therapeutic approaches. *Curr Opin Anaesthesiol* 2016;29(1):94-100.
- [5] Pfeifer R, Heussen N, Michalewicz E, Hilgers RD, Pape HC. Incidence of adult respiratory distress syndrome in trauma patients: A systematic review and meta-analysis over a period of three decades. *J Trauma Acute Care Surg* 2017;83(3):496-506.
- [6] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29(7):1303-10.
- [7] Blanco J, Muriel-Bombín A, Sagredo V, Taboada F, Gandía F, Tamayo L, et al. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicenter study. . *Crit Care* 2008;12:R158.
- [8] Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med* 1992;20(6):724-6.
- [9] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003;29(4):530-8.
- [10] Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996;22(7):707-10.
- [11] Bone RC. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA* 1992;268(24):3452-5.
- [12] Wheeler A, Bearnd G. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med* 1999;340:207-14.
- [13] Zilberberg MD, Epstein SK. Acute lung injury in the medical ICU: comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(4 Pt 1):1159-64.
- [14] Vincent JL, Abraham E, Annane D, Bernard G, Rivers E, Van den Berghe G. Reducing mortality in sepsis: new directions. *Crit Care* 2002;6 Suppl 3:S1-18.
- [15] Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med* 1995;23(10):1638-52.
- [16] Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. . *JAMA* 1995;274:968-74.
- [17] Chau-Chyun Sheu, Michelle N. Gong, Rihong Zhai, Feng Chen, Ednan K. Bajwa, Peter F. Clardy, et al. Clinical Characteristics and Outcomes of Sepsis-Related vs Non-Sepsis-Related ARDS. *CHEST* 2010;138(3):559-567.

- [18] Sevransky J, Martin G, Shanholtz C, Mendez-Tellez P, Pronovost P, Brower R, et al. Mortality in sepsis versus non-sepsis induced acute lung injury. *Critical Care* 2009; 13:R150 2009.
- [19] Gajic O, Dabbagh O, Park PK, Adesanya A, Chang S, Hou P, et al. Early identification of patients at risk of acute lung injury: evaluation of the lung injury prediction score in a multicenter cohort study. *Amer J Respir Crit Care Med* 2011; 183:462–470 2011.
- [20] Fein AM, Calalang-Colucci MG. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. *Crit Care Clin* 2000;16(2):289-317.
- [21] McClintock D, Zhuo H, Wickersham N, Matthay MA, Ware LB. Biomarkers of inflammation, coagulation and fibrinolysis predict mortality in acute lung injury. *Crit Care* 2008;12(2):R41.
- [22] Nys M D-DG, Habraken Y, Legrand-Poels S, Ledoux D, Canivet JL, Damas P, Lamy M. Bronchoalveolar lavage fluids of patients with lung injury activate the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B in an alveolar cell line. *Clinical Science* 2002;103:577-85.
- [23] Persoons J SK, Breve J, Berkenbosch F, Kraal G. Acute stress affects cytokines and nitric oxide production by alveolar macrophages differently. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:619-24.
- [24] Bone RC, Balk R, Slotman G, Maunder R, Silverman H, Hyers TM, et al. Adult respiratory distress syndrome. Sequence and importance of development of multiple organ failure. The Prostaglandin E1 Study Group. *Chest* 1992;101(2):320-6.
- [25] Flori H, Sapru A, Quasney M, Gildengorin G, Curley M, Matthay M, et al. A prospective investigation of interleukin-8 levels in pediatric acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 2019;17;23(1):128 2019.
- [26] Artigas A, Bernard GR, Carlet J, Dreyfuss D, Gattinoni L, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS, part 2: Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. Acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(4 Pt 1):1332-47.
- [27] Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(3 Pt 1):818-24.
- [28] Schuster D. What is acute lung injury? What is ARDS? *Chest* 1995;107:1721-26.
- [29] ARDS Definition Task Force RV, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012;307(23):2526-33.
- [30] Camporota L, Ranieri VM. What's new in the "Berlin" definition of acute respiratory distress syndrome? *Minerva Anestesiol* 2012;78(10):1162-6.
- [31] Ferguson ND, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Beale R, et al. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Med* 2012;38(10):1573-82.
- [32] Schuster DP. Quantifying lung injury in ARDS. . In: Acute lung injury Marini JJ and Evans TW editors Springer Verlag Berlin Heidelberg 1998: 181-96.
- [33] Evans T, Smithies M. Organ dysfunction. *BMJ* June 12, 1999 1999.
- [34] Fridovich I. The chemistry of dioxygen and its reduction products. . In: Oxygen free radicals and tissue damage Excerpta Medica, Amsterdam 1979 1979:19-42
- [35] Quinlan G, Lamb N, Evans T, et al. Plasma fatty acid changes and lipoperoxidation in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1996; 24: 241-246 1996.
- [36] Buegue J, Aust S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology.* ( Fleischeir S and Parker L, eds) Vol 52, part C : 302-310. Academic Press , New York . 1978 *Methods*

- in enzymology ( Fleischeir S and Parker L, eds) Vol 52, part C : 302-310 Academic Press , New York 1978
- [37] McCord JM. Oxygen- derived free radicals in postischemic injury. *N Engl J Med* ; 1985 312: 159-63 1985.
- [38] McCord JM. Oxygen-derived free radicals. *New Horizons* 1993; 1:70-76 1993.
- [39] Granger DN, McCord JM, Parks DA, et al. Xanthine oxidase inhibitors attenuates ischemia-induced vascular permeability changes in the cat's intestine. *Gastroenterology* 1986;90: 80-84 1986.
- [40] Fridovich I. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997;25;272(30):18515-7 1997
- [41] McCord J, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (heinz)". *The Journal of Biological Chemistry* 244 (22): 6049–55 1969.
- [42] Gaetani G, Ferraris A, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman H. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 87 (4): 1595–9 1996.
- [43] Toppo S, Flohé L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta* 2009 Nov;1790(11):1486-500 2009.
- [44] Koch T. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* (1999) 25: 134-136 1999.
- [45] Cowley H, Bacon P, Goode H, Webster N, Jones J, Menon D. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit Care Med* 1996 Jul;24(7):1179-83 1996
- [46] Metnitz PG, Bartens C, Fischer M, Fridrich P, Steltzer H, Drum IW. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1999 Feb;25(2):180-5 1999
- [47] Pacht ER, Timerman AP, Lykens MG, Merola AJ. Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1991 Nov;100(5):1397-403 1991.
- [48] Goode H, Cowley H, Walker B. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in shock and patients with septic secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 1995; 23: 646-651 1995.
- [49] Lamb NJ, Guttridge JM, Baker C, Evans TW, Quinlan GJ. Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. *Crit Care Med* 1999;27:1738-44.
- [50] Zeida A, Trujillo M, Ferrer-Sueta G, Denicola A, Estrin DA, Radi R. Catalysis of Peroxide Reduction by Fast Reacting Protein Thiols. *Chem Rev* 2019;119(19):10829-55.
- [51] Hattori F, Murayama N, Noshita T, Oikawa S. Mitochondrial peroxiredoxin-3 protects hippocampal neurons from excitotoxic injury in vivo. *J Neurochem* 2003;86(4):860-8.
- [52] Hattori F, Oikawa S. Peroxiredoxins in the central nervous system. *Subcell Biochem* 2007;44:357-74.
- [53] De Simoni S, Goemaere J, Knoop B. Silencing of peroxiredoxin 3 and peroxiredoxin 5 reveals the role of mitochondrial peroxiredoxins in the protection of human neuroblastoma SH-SY5Y cells toward MPP<sup>+</sup>. *Neurosci Lett* ;433(3):219-24 2008.
- [54] De Armas MI, Esteves R, Viera N, Reyes AM, Mastrogianni M, Alegria TGP, et al. Rapid peroxynitrite reduction by human peroxiredoxin 3: Implications for the fate of oxidants in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2019;130:369-78.
- [55] Sies H, Jones D. Oxidative stress. In: Fink G (eds) *Encyclopedia of stress* 2nd edn, vol 3, Elsevier, Amsterdam, pp 45–48, 2007 2007.



- [56] Sies H. The Concept of Oxidative Stress After 30 Years In: Ricardo Jorge Gelpi, Alberto Boveris, Juan José Poderoso Editors, *Biochemistry of Oxidative Stress Physiopathology and Clinical Aspects* Springer International Publishing Switzerland 2016, pp 1- 9 2016.
- [57] Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. . In: Sies H (ed) *Oxidative stress* Academic, London, pp 1–8 1985.
- [58] Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. . *Redox Biol* 4:180–183 2015.
- [59] Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Puhl H, Tatzber F. Endogenous antioxidants and lipoprotein oxidation. *Biochem Soc Trans* 1990;18(6):1059-61.
- [60] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11(1):81-128.
- [61] Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem* 2017;524:13-30.
- [62] Pryor WA, Stanley JP. Letter: A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem* 1975;40(24):3615-7.
- [63] Pryor WA, Stanley JP, Blair E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* 1976;11(5):370-9.
- [64] Frankel EN. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Prog Lipid Res* 1984;23(4):197-221.
- [65] Frankel EN, Neff WE, Brooks DD, Fujimoto K. Fluorescence formation from the interaction of DNA with lipid oxidation degradation products. *Biochim Biophys Acta* 1987;919(3):239-44.
- [66] Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem* 2017; 1;524:13-30 2017.
- [67] Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15(4):316-28.
- [68] Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994;269(42):26066-75.
- [69] Botti H, Batthyany C, Trostchansky A, Radi R, Freeman BA, Rubbo H. Peroxynitrite-mediated alpha-tocopherol oxidation in low-density lipoprotein: a mechanistic approach. *Free Radic Biol Med* 2004;36(2):152-62.
- [70] Frey R, Ushio-Fukai M, Malik A. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 2009 Apr;11(4):791-810 2009.
- [71] Baldwin SR, Grum CM, Boxer LA, et al. Oxidant activity of expired breath in patients with respiratory adult distress syndrome *Lancet* 1986; 1: 11-14 1986.
- [72] Cochrane CG, Spragg R, SD. R. Pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. Evidence of oxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Invest* 1983 Mar;71(3):754-61 1983.
- [73] Laurent T, Market M, Feithl F, et al. Oxidant-Antioxidant balance in granulocyte during ARDS.Effect of N-Acetylcysteine. *Chest* 1996;109:163-6.
- [74] Leff J, Parson P, Day C. Increased serum catalase activity in septic patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 985-989 1992.



- [75] Laurent T, Markert M, Feihl F, Schaller MD, Perret C. Oxidant-antioxidant balance in granulocytes during ARDS. Effect of N-acetylcysteine. *Chest* 1996 Jan;109(1):163-6 1996.
- [76] Bunnell E, Pacht E. Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with the adult respiratory distress. *Am Rev Respir Dis* 1993.
- [77] Sznajder J, Fraiman A, Hall J, Sanders W, Schmidt G, Crawford G, et al. Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 1989 Sep;96(3):606-12 1989.
- [78] Baldwin S, Simon R, Grum C, Ketani L, Boxer L, Devall L. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1986(4);1(8471):11-4 1986.
- [79] Kietzmann D, Kahl R, Müller M, Burchardi H, Kettler D. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med* 1993;19(2):78-81 1993.
- [80] Liu D, Luo G, Luo C, Wang T, Sun G, Z. H. Changes in the Concentrations of Mediators of Inflammation and Oxidative Stress in Exhaled Breath Condensate During Liver Transplantation and Their Relations With Postoperative ARDS. *Respir Care* 2015 May;60(5):679-88 2015.
- [81] Mathru M, Rooney M, Dries D, Hirsch L, Barnes L, Tobin M. Urine hydrogen peroxide during adult respiratory distress syndrome in patients with and without sepsis. *Chest* 1994 Jan;105(1):232-6 1994.
- [82] Mulier B, Rahman I, Watchorn T, Donaldson K, MacNee W, Jeffery P. Hydrogen peroxide-induced epithelial injury: the protective role of intracellular nonprotein thiols (NPSH). *Eur Respir J* 1998 Feb;11(2):384-91 1998.
- [83] Cross C, Forte T, Stocker R, Louie S, Yamamoto Y, Ames B, et al. Oxidative stress and abnormal cholesterol metabolism in patients with adult respiratory distress syndrome. *Lab Clin Med* 1990 Apr;115(4):396-404 1990.
- [84] Nakae H, Endo S, Takakuwa T, Inada K, Yoshida M. Relationship between alpha-tocopherol and polymorphonuclear leukocyte elastase in septic adult respiratory distress syndrome. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1995 Jul;89(1):93-100 1995.
- [85] Schmidt R, Luboinski T, Markart P, Ruppert C, Daum C, Grimminger F, et al. Alveolar antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J* 2004;24(6):994-9 2004
- [86] Frass OM, Bühling F, Täger M, Frass H, Ansorge S, Huth C, et al. Antioxidant and antiprotease status in peripheral blood and BAL fluid after cardiopulmonary bypass. *Chest* 2001 Nov;120(5):1599-608 2001
- [87] Lykens M, Davis W, Pacht E. Antioxidant activity of bronchoalveolar lavage fluid in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Physiol* 1992 Feb;262(2 Pt 1):L169-75 1992
- [88] Tangney C, Stibolt TJ, Zheutlin L, Jacobs E, Hanley M. Comparison of vitamin E levels in plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissues of adult pulmonary patients. *J Am Coll Nutr* 1989 Jun;8(3):203-14 1989.
- [89] Nakae H, Endo S, Inada K, Kasai T, Yoshida M. Significance of alpha-tocopherol and interleukin 8 in septic adult respiratory distress syndrome. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1994 May;84(2):197-202 1994.
- [90] Leff JA, Parsons PE, Day CE, Moore EE, Moore FA, O'Peppard MA, et al. Increased serum catalase activity in septic patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1992 Oct;146(4):985-9 1992
- [91] Chollet-Martin S, Montravers P, Gibert C, Elbim C, Desmots J, Fagon J, et al. High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Infect Immun* 1993 Nov;61(11):4553-9 1993.
- [92] Suter P, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau G, Dayer J. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and

- elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis* 1992 May;145(5):1016-22 1992.
- [93] Bertozzi P, Astedt B, Zenzius L, Lynch K, LeMaire F, Zapol W, et al. Depressed bronchoalveolar urokinase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1990 Mar 29;322(13):890-7 1990.
- [94] Nakane M, Iwama H. Intra-alveolar urinary trypsin inhibitor cannot inhibit polymorphonuclear elastase activity in the lung in postsurgical patients with acute respiratory distress syndrome. *Surg Today* 1999;29(10):1030-3 1999.
- [95] Gadek J, Pacht E. The interdependence of lung antioxidants and antiprotease defense in ARDS. *Chest* 1996 Dec;110(6 Suppl):273S-277S 1996.
- [96] Furchgott RF, Zawadzki JW. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of vascular smooth muscle by acetyl-choline. *Nature* 1980;286:373-6
- [97] Furchgott RF. The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA* 1996;276(14):1186-8.
- [98] Ignarro LJ, Buga GM, Woods KS. Ignarro LJ, Buga GM, Woods KS. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9265-9.
- [99] Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-26.
- [100] Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: Discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Nobel Lectures in Physiology or Medicine 1996-2000*, ed Jornvall H (World Scientific Publishing Company, Singapore) 2003:152-69.
- [101] Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1996;9(5):836-44.
- [102] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
- [103] 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(7):4244-50.
- [104] Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991;288(2):481-7.
- [105] Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(4):1620-4.
- [106] Aicardo A, Martinez D, Nicolás C, Silvina B, Rafael R. Biochemistry of Nitric Oxide and Peroxynitrite: Sources, Targets and Biological Implications. In: Ricardo Jorge Gelpi, Alberto Boveris, Juan José Poderoso Editors *Biochemistry of Oxidative Stress Physiopathology and Clinical Aspects* Springer International Publishing Switzerland 2016, pp 49-79 2016.
- [107] Peluffo G, Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology *Cardiovasc Res* 75:291–302 2007.
- [108] Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6(8):662-80.
- [109] Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:431-7.
- [110] Ischiropoulos H, Al-Mehdi A, Fisher A. Reactive species in lung ischemia-reperfusion injury: Contribution of peroxynitrite. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: A552.
- [111] Royall JA, Kooy NW, Beckman JS. Nitric oxide-related oxidants in acute lung injury. *New Horiz* 1995;3(1):113-22.

- [112] Calcerrada P, Peluffo G, Radi R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Curr Pharm Des* 2011;17(35):3905-32.
- [113] Cantlay K, Clarke M, Wallis J, Cosgrove JF. Immediate postoperative prone ventilation in the management of transfusion-related acute lung injury (TRALI) following infra-renal abdominal aortic aneurysm repair. *Anaesth Intensive Care* 2006;34(4):521-2.
- [114] Luo L, Shaver CM, Zhao Z, Koyama T, Calfee CS, Bastarache JA, et al. Clinical Predictors of Hospital Mortality Differ Between Direct and Indirect ARDS. *Chest* 2017 151(4):755-763.
- [115] Nunns GR, Stringham JR, Gamboni F, Moore EE, Fragoso M, Stettler GR, et al. Trauma and hemorrhagic shock activate molecular association of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-Activating protein in lung tissue. *J Surg Res* 2018;229:262-270.
- [116] Bhadade R, de Souza R, Harde M, Khot A. Clinical characteristics and outcomes of patients with acute lung injury and ARDS. *J Postgrad Med* 2011;57(4):286-90.
- [117] Wright SE, Snowden CP, Athey SC, Leaver AA, Clarkson JM, Chapman CE, et al. Acute lung injury after ruptured abdominal aortic aneurysm repair: the effect of excluding donations from females from the production of fresh frozen plasma. *Crit Care Med* 2008;36(6):1796-802. .
- [118] Pararajasingam R, Weight SC, Bell PR, Nicholson ML, Sayers RD. Pulmonary nitric oxide metabolism following infrarenal aortic cross-clamp-induced ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19(1):47-51 2000.
- [119] Harkin DW, Rubin BB, Romaschin A, Lindsay TF. Selective inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibition attenuates remote acute lung injury in a model of ruptured abdominal aortic aneurysm. *J Surg Res* 2004;120(2):230-41 2004
- [120] Szabó C, Billiar T. Novel roles of nitric oxide in hemorrhagic shock. *Shock* 1999 Jul;12(1):1-9 1999.
- [121] Slater T. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984; 22: 1-15 1984.
- [122] Esterbauer H, Puhl H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Rabl H. Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Ann Med* 1991;23(5):573-81.
- [123] Borrelli E, Giomarelli P, Chiara O, Casini A, Betti S, Sabatini L, et al. Lipid peroxidation and lung ultrastructural changes in an experimental model of leukocyte-mediated pulmonary injury. *Lung* 1990;168(1):35-42.
- [124] Mishra V, Baines M, Wenstone R, Shenkin A. Markers of oxidative damage, antioxidant status and clinical outcome in critically ill patients. *Ann Clin Biochem* 2005;42(Pt 4):269-76.
- [125] Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr* 1991;53(1 Suppl):314S-21S.
- [126] Granger DN, McCord JM, Parks D, et al. Granger DN, McCord JM, Parks DA. et al. Xanthine oxidase inhibitors attenuates ischemia-induced vascular permeability changes in the cats intestine. *Gastroenterology* 1986;90: 80-84. 1986.
- [127] Nieman G, Gatto L, Habashi N. Impact of mechanical ventilation on the pathophysiology of progressive acute lung injury. *J Appl Physiol* (1985) 2015 Dec 1;119(11):1245-61 2015.
- [128] Li L, Lee C, Liu Y, Chang C, Lin C, Chiu L, et al. Activation of Src-dependent Smad3 signaling mediates the neutrophilic inflammation and oxidative stress in hyperoxia-augmented ventilator-induced lung injury. *Respir Res* 2015 Sep 16;16:112 2015.
- [129] Nieman G, Satalin J, Kollisch-Singule M, Andrews P, Aiash H, Habashi N, et al. Physiology in Medicine: Understanding dynamic alveolar physiology to minimize ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol* (1985) 2017 Jun 1;122(6):1516-1522 2017.

- [130] Frank JA, Pittet JF, Lee H, Godzich M, Matthay MA. High tidal volume ventilation induces NOS2 and impairs cAMP- dependent air space fluid clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284(5):L791-8.
- [131] Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, de Perrot M, Fischer S, Edwards V, et al. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 2003;289(16):2104-12.
- [132] Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H, Lange T, Engelmann L, Schauer J, et al. Exhaled breath condensate nitrite and its relation to tidal volume in acute lung injury. *Chest* 2003;124(3):1046-52.
- [133] Memtsoudis SG, Bombardieri AM, Ma Y, Girardi FP. The effect of low versus high tidal volume ventilation on inflammatory markers in healthy individuals undergoing posterior spine fusion in the prone position: a randomized controlled trial *J Clin Anesth* 2012 Jun;24(4):263-9 2012.
- [134] Silva P, Negrini D, Rocco PR. Mechanisms of ventilator-induced lung injury in healthy lungs. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2015 Sep;29(3):301-13 2015
- [135] Kelly GT, Faraj R, Zhang Y, Maltepe E, Fineman JR, Black SM, et al. Pulmonary Endothelial Mechanical Sensing and Signaling, a Story of Focal Adhesions and Integrins in Ventilator Induced Lung Injury. *Front Physiol* 2019 Apr 26;10:511 2019.
- [136] Fernandez-Bustamante A, J. K, Repine J, Agazio A, Janocha A, Shah C, et al. Early effect of tidal volume on lung injury biomarkers in surgical patients with healthy lungs. . *Anesthesiology* 2014 Sep;121(3):469-81 2014.
- [137] Goodman RB, Pugin J, Lee JS, Matthay MA. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14(6):523-35.
- [138] Cadenas E, Sies H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Adv Enzyme Regul* 1985;23:217-37.
- [139] Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991;91(3C):31S-8S.
- [140] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997;82(2):291-5.
- [141] Montgomery B, Carrico J, et a. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 485-489.
- [142] Moore F, Moore EE, Read R. Postinjury multiple organ failure: role of extrathoracic injury and sepsis in adult respiratory distress syndrome. . *New Horizons* 1993; 1:538-549 1993.
- [143] Pittet P, Mackersie RC, Martin TR, Matthay M. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenic significance. . *Am Respir Crit Care Med* 1997; 155:1187-1205 1997.
- [144] Shanley TP, Zhao B, Macariola DR, Denenberg A, Salzman AL, Ward PA. Role of nitric oxide in acute lung inflammation: lessons learned from the inducible nitric oxide synthase knockout mouse. *Crit Care Med* 2002;30(9):1960-8.
- [145] Hinder F, Meyer J, Booke M, Ehardt JS, Salsbury JR, Traber LD, et al. Endogenous nitric oxide and the pulmonary microvasculature in healthy sheep and during systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(5 Pt 1):1542-9.
- [146] Nelson A, Rossman M, Witman M, Barrett-O'Keefe Z, Groot H, Garten R, et al. Nitric oxide-mediated vascular function in sepsis using passive leg movement as a novel assessment: a cross-sectional study. *J Appl Physiol (1985)* 2016; 120(9):991-9 2016.
- [147] Russell J, Rush B, Boyd J. Pathophysiology of Septic Shock. . *Crit Care Clin* 2018 Jan; 34(1): 43-61 2018.
- [148] Boisramé-Helms J, Kremer H, Schini-Kerth V, Meziani F. Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol* 2013;11(2):150-60 2013.
- [149] Kimmoun A, Ducrocq N, Levy B. Mechanisms of vascular hyporesponsiveness in septic shock. *Curr Vasc Pharmacol* 2013 Mar 1;11(2):139-49 2013.

- [150] Cauwels A, Brouckaert P. Nitrite regulation of shock. *Cardiovasc Res* 2011;89(3):553-9 2011
- [151] Levy B, Collin S, Sennoun N, Ducrocq N, Kimmoun A, Asfar P, et al. Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Med* 2010 Dec;36(12):2019-29 2010
- [152] Szabo C. Role of nitric oxide in endotoxic shock. An overview of recent advances. *Ann N Y Acad Sci* 1998;851:422-5.
- [153] Matsuo N. The role of intrapulmonary nitric oxide generation in the development of adult respiratory distress syndrome. *Surg Today* 1999;29(10):1068-74.
- [154] Lamb N QG, Westerman S, Guttridge JM, Evans TW. Nitration of proteins in bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute respiratory distress syndrome receiving inhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1031-4.
- [155] Engelberger R, Pittet Y, Henry H, Delodder F, Hayoz D, Chioléro R, et al. Acute endotoxemia inhibits microvascular nitric oxide-dependent vasodilation in humans. *Shock* 2011;35(1):28-34 2011.
- [156] Joyner M. Nitric Oxide, Normal Science, and Lessons Learned by a Marginally Prepared Mind. *Perspect Biol Med* 2018;61(2):191-200 2018.
- [157] Nelson A, Rossman M, Witman M, Barrett-O'Keefe Z, Groot H, Garten R, et al. Nitric oxide-mediated vascular function in sepsis using passive leg movement as a novel assessment: a cross-sectional study *J Appl Physiol (1985)* 2016;120(9):991-9 2016
- [158] Shanley TP, Zhao B, Macariola DR, Denenberg A, Salzman AL, PA. W. Role of nitric oxide in acute lung inflammation: lessons learned from the inducible nitric oxide synthase knockout mouse. *Crit Care Med* 2002;30(9):1960-8.
- [159] Heremans H, Dillen C, Groenen M, Matthys P, Billiau A. Role of interferon-gamma and nitric oxide in pulmonary edema and death induced by lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(1):110-7.
- [160] Crow JP, Beckman JS. The importance of superoxide in nitric oxide-dependent toxicity: evidence for peroxynitrite-mediated injury. *Adv Exp Med Biol* 1996;387:147-61.
- [161] Haddad IY, Crow JP, Hu P, Ye Y, Beckman J, Matalon S. Concurrent generation of nitric oxide and superoxide damages surfactant protein A. *Am J Physiol* 1994;267(3 Pt 1):L242-9.
- [162] Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 2001;30(5):463-88.
- [163] Khadour FH, O'Brien DW, Fu Y, Armstrong PW, Schulz R. Endothelial nitric oxide synthase increases in left atria of dogs with pacing-induced heart failure. *Am J Physiol* 1998;275(6 Pt 2):H1971-8.
- [164] Petruska JM, Leslie KO, Mossman BT. Enhanced lipid peroxidation in lung lavage of rats after inhalation of asbestos. *Free Radic Biol Med* 1991;11(4):425-32.
- [165] Khadour FH, Panas D, Ferdinandy P, Schulze C, Csont T, Lalu MM, et al. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(3):H1108-15.
- [166] Wu F, Cepinkas G, Wilson JX, Tyml K. Nitric oxide attenuates but superoxide enhances iNOS expression in endotoxin- and IFN $\gamma$ -stimulated skeletal muscle endothelial cells. *Microcirculation* 2001;8(6):415-25.
- [167] Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J Biol Chem* 2000;275(42):32460-6.
- [168] Szabo C, Csaki C, Benyo Z, Reivich M, Kovach AG. Role of the L-arginine-nitric oxide pathway in the changes in cerebrovascular reactivity following hemorrhagic hypotension and retransfusion. *Circ Shock* 1992;37(4):307-16.
- [169] Zhu S, Ware LB, Geiser T, Matthay MA, Matalon S. Increased levels of nitrate and surfactant protein a nitration in the pulmonary edema fluid of patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(1):166-72.



- [170] Beckman JS, Ye YZ, Chen J, Conger KA. The interactions of nitric oxide with oxygen radicals and scavengers in cerebral ischemic injury. *Adv Neurol* 1996;71:339-50; discussion 50-4.
- [171] Mathy-Hartert M, Damas P, Nys M, Deby-Dupont G, Canivet JL, Ledoux D, et al. Nitrated proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients at risk of ventilator-associated bronchopneumonia. *Eur Respir J* 2000;16:296-301.
- [172] Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT, Myles C, Zhu S, Goodman RB, et al. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(2):503-10.
- [173] Peluffo G, Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res* 2007;75(2):291-302.
- [174] Zilberg MD and Epstein S. Acute lung injury in the medical ICU. Comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1159-64.
- [175] Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 1991;214(5):621-6.
- [176] Kooy NW, Lewis SJ, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite. *Crit Care Med* 1997;25(5):812-9.
- [177] Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(4):1250-4.
- [178] Strand OA, Leone A, Giercksky KE, Kirkeboen KA. Nitric oxide indices in human septic shock. *Crit Care Med* 2000;28(8):2779-85.
- [179] Kobayashi A, Hashimoto S, Kooguchi K, Kitamura Y, Onodera H, Urata Y, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and inflammatory cytokines in alveolar macrophages of ARDS following sepsis. *Chest* 1998;113(6):1632-9.
- [180] Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest* 2002;122(6 Suppl):314S-20S.
- [181] Lorentzen LG, Chuang CY, Rogowska-Wrzesinska A, Davies MJ. Identification and quantification of sites of nitration and oxidation in the key matrix protein laminin and the structural consequences of these modifications. *Redox Biol* 2019;24:101226.
- [182] Vanichkitrungruang S, Chuang CY, Hawkins CL, Hammer A, Hoefler G, Malle E, et al. Oxidation of human plasma fibronectin by inflammatory oxidants perturbs endothelial cell function. *Free Radic Biol Med* 2019;136:118-34.
- [183] Degendorfer G, Chuang CY, Kawasaki H, Hammer A, Malle E, Yamakura F, et al. Peroxynitrite-mediated oxidation of plasma fibronectin. *Free Radic Biol Med* 2016;97:602-15.
- [184] Chuang CY, Degendorfer G, Hammer A, Whitelock JM, Malle E, Davies MJ. Oxidation modifies the structure and function of the extracellular matrix generated by human coronary artery endothelial cells. *Biochem J* 2014;459(2):313-22.
- [185] Kennett EC, Rees MD, Malle E, Hammer A, Whitelock JM, Davies MJ. Peroxynitrite modifies the structure and function of the extracellular matrix proteoglycan perlecan by reaction with both the protein core and the heparan sulfate chains. *Free Radic Biol Med* 2010;49(2):282-93.
- [186] Davis IC, Zhu S, Sampson JB, Crow JP, Matalon S. Inhibition of human surfactant protein A function by oxidation intermediates of nitrite. *Free Radic Biol Med* 2002;33(12):1703-13.
- [187] Matalon S, Shrestha K, Kirk M, Waldheuser S, McDonald B, Smith K, et al. Modification of surfactant protein D by reactive oxygen-nitrogen intermediates is accompanied by loss of aggregating activity, in vitro and in vivo. *FASEB J* 2009;23(5):1415-30.
- [188] Zhu S, Manuel M, Tanaka S, Choe N, Kagan E, Matalon S. Contribution of reactive oxygen and nitrogen species to particulate-induced lung injury. *Environ Health Perspect* 1998;106 Suppl 5:1157-63.

- [189] Hickman-Davis JM, Lindsey JR, Zhu S, Matalon S. Surfactant protein A mediates mycoplasmacidal activity of alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1998;274(2 Pt 1):L270-7.
- [190] Zhu S, Basiouny KF, Crow JP, Matalon S. Carbon dioxide enhances nitration of surfactant protein A by activated alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278(5):L1025-31.
- [191] Zhu S, Haddad IY, Matalon S. Nitration of surfactant protein A (SP-A) tyrosine residues results in decreased mannose binding ability. *Arch Biochem Biophys* 1996;333(1):282-90.
- [192] Zhu S, Kachel DL, Martin WJ, 2nd, Matalon S. Nitrated SP-A does not enhance adherence of *Pneumocystis carinii* to alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1998;275(6 Pt 1):L1031-9.
- [193] Armand MD, Ware LB, Bagshaw SM. How could biomarkers of ARDS and AKI drive clinical strategies? . *Intensive Care Med* 2016;DOI 10.1007/s00134-016-4231-9.
- [194] Singer M, Deutschman C, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Auer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 23;315(8):801-10 2016.
- [195] Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012;307(23):2526-33.
- [196] Khemani RG, Wilson DF, Esteban A, Ferguson ND. Evaluating the Berlin Definition in pediatric ARDS. *Intensive Care Med* 2013;39(12):2213-6.
- [197] Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13(10):818-29.
- [198] Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. Report of the American-European Consensus conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Consensus Committee. *J Crit Care* 1994;9(1):72-81.
- [199] Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1988;138(3):720-3.
- [200] Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001;5(1):62-71.
- [201] Moller MN, Rios N, Trujillo M, Radi R, Denicola A, Alvarez B. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. *J Biol Chem* 2019;294(40):14776-802.
- [202] Pilz J, Meineke I, Gleiter CH. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;742(2):315-25.
- [203] Steghens JP, van Kappel AL, Denis I, Collombel C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. *Free Radic Biol Med* 2001;31(2):242-9.
- [204] Sim AS, Salonikas C, Naidoo D, Wilcken DE. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;785(2):337-44.
- [205] Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;186:421-31.
- [206] Drury JA, Nycyk JA, Cooke RW. Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. *Clin Chim Acta* 1997;263(2):177-85.
- [207] Petruska JM, Wong SH, Sunderman FW, Jr., Mossman BT. Detection of lipid peroxidation in lung and in bronchoalveolar lavage cells and fluid. *Free Radic Biol Med* 1990;9(1):51-8.

- [208] Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-21.
- [209] Lykkesfeldt J. Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. *Clin Chem* 2001;47(9):1725-7.
- [210] Naviliat M, Gualco G, Cayota A, Radi R. Protein 3-nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(12):1825-34.
- [211] Batthyany C, Bartesaghi S, Mastrogiovanni M, Lima A, Demicheli V, Radi R. Tyrosine-Nitrated Proteins: Proteomic and Bioanalytical Aspects. *Antioxid Redox Signal* 2017;26(7):313-28.
- [212] Unwin RD, Griffiths JR, Whetton AD. A sensitive mass spectrometric method for hypothesis-driven detection of peptide post-translational modifications: multiple reaction monitoring-initiated detection and sequencing (MIDAS). *Nat Protoc* 2009;4(6):870-7.
- [213] Teissier E, Walters-Laporte E, Duhem C, Luc G, Fruchart JC, P. D. Rapid quantification of alpha-tocopherol in plasma and low- and high-density lipoproteins. *Clin Chem* 1996;42:430-5.
- [214] Teissier E W-LE, Duhem C, Luc G., Fruchart JC, Duriez P. Rapid quantification of alpha-tocopherol in plasma and low- and high-density lipoproteins. *Clin Chem* 1996;42:430-5.
- [215] De Andrade JA, Crow JP, Viera L, Bruce Alexander C, Randall Young K, McGiffin DC, et al. Protein nitration, metabolites of reactive nitrogen species, and inflammation in lung allografts. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(6):2035-42.
- [216] Peluffo G, Calcerrada P, Piacenza L, Pizzano N, Radi R. Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296(6):H1781-92.
- [217] Marshall JC, Vincent JL, Fink MP, Cook DJ, Rubenfeld G, Foster D, et al. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit Care Med* 2003;31(5):1560-7.
- [218] Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 1994;94(6):2407-13.
- [219] Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction *Intensive Care Med* 2000 Apr;26(4):474-6 2000.
- [220] Draper HH HM. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. In: *Methods in Enzymol*, vol 186, Part B, L Packer Ed, 1990, New York 1990:421-31.
- [221] Esterbauer E CK. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. In: *Methods in Enzymol*, vol 186, Part B, L Packer Ed, 1990, New York 1990:407-31.
- [222] Ceconi C CA, Pasini E, Condorelli E, Curello S, Ferrari R. Evaluation of phospholipid peroxidation as malondialdehyde during myocardial ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol* 1991;260:H1057-H61.
- [223] Chirico S. High-Performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. In: *Methods in Enzymol*, vol 233, L Packer Ed, 1994, New York 1994:314-8.
- [224] Brown RK KF. Peroxides and other products. In: *Free Radicals A practical approach* 1996:119-31, Oxford University Press, Oxford, 1996.
- [225] Verbunt R EJ, Van der Laarse A. Risk of overestimation of free malondialdehyde in perfused rat hearts due to homogeneity artifacts. *Cardiovasc Res* 1996;31:603-6.
- [226] Jones S, Carley S, Harrison M. An introduction to power and sample size estimation. *Emerg Med J* 2003; 20(5):453-8.



- [227] Flahault A, Cadilhac M, Thomas G. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. . J Clin Epidemiol 2005 Aug;58(8):859-62.
- [228] Antoine F, Michel C, Guy T. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. . Journal of Clinical Epidemiology 58 (2005) 859–862.
- [229] Buderer N. Statistical methodology: I. Incorporating the prevalence of disease into the sample size calculation for sensitivity and specificity. Acad Emerg Med 1996 Sep;3(9):895-900.
- [230] Dendukuri N, Rahme E, Bélisle P, Joseph L. Bayesian Sample Size Determination for Prevalence and Diagnostic Test Studies in the Absence of a Gold Standard Test. . Biometrics, 60(2), 388–397.
- [231] Whidden MA, McClung JM, Falk DJ, Hudson MB, Smuder AJ, Nelson WB, et al. Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. . J Appl Physiol (1985) 2009 ;106(2):385-94
- [232] Luchtemberg MN, Petronilho F, Constantino L, Gelain DP, Andrades M, Ritter C, et al. Experimental Xanthine oxidase activity in patients with sepsis. Clin Biochem 2008 Oct;41(14-15):1186-90
- [233] Brandes RP, Koddenberg G, Gwinner W, Kim Dy, Kruse HJ, Busse R, et al. Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. Hypertension. 1999 May;33(5):1243-9.
- [234] Devrim E, Avci A, Ergüder IB, Karagenç N, Külah B, Durak. Activities of xanthine oxidase and superoxide dismutase enzymes in rat intestinal tissues in sepsis. J Trauma. 2008 Mar;64(3):733-5.
- [235] Metnitz PG, Bartens C, Fischer M, Fridrich P, Steltzer H, Druml W. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. Intensive Care Med 1999;25(2):180-5.
- [236] Quinlan G, Lamb N, Tilley R, Evans T, Gutteridge J. Plasma hypoxanthine levels in ARDS: implications for oxidative stress, morbidity, and mortality. Am J Respir Crit Care Med. 1997;155(2):479-84.
- [237] Bertrand Y, Pincemail J, Hanique G, Denis B, Leenaerts L, Vankeerberghen L, et al. Differences in tocopherol-lipid ratios in ARDS and non-ARDS patients. Intensive Care Med 1989;15(2):87-93.
- [238] Nakae H, Endo S, Inada K, Kasai T, Yoshida M. Significance of alpha-tocopherol and interleukin 8 in septic adult respiratory distress syndrome. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1994;84(2):197-202.
- [239] Tangney CC, Stibolt TB, Jr., Zheutlin L, Jacobs E, Hanley M. Comparison of vitamin E levels in plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissues of adult pulmonary patients. J Am Coll Nutr 1989;8(3):203-14.
- [240] Nathens AB, Neff MJ, Jurkovich GJ, Klotz P, Farver K, Ruzinski JT, et al. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. Ann Surg 2002;236(6):814-22.
- [241] Flahault A, Cadilhac M, Thomas G. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. J Clin Epidemiol 2005;58(8):859-62.



## Lung nitroxidative stress in mechanically-ventilated septic patients: A pilot study

J. Gorrasi<sup>a,b,c,\*</sup>, G. Peluffo<sup>c,d,†</sup>, H. Botti<sup>c,d</sup>, C. Batthyany<sup>c,e</sup>, M. Naviliat<sup>c,f</sup>, E. Barrios<sup>g</sup>, H. Correa<sup>h</sup>, R. Radi<sup>c,d</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Emergencia, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Centro de Tratamiento Intensivo, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup> Center for Free Radical and Biomedical Research (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>e</sup> Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

<sup>f</sup> Cátedra de Reumatología, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay

<sup>g</sup> Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>h</sup> Facultad de Medicina, Centro Latinoamericano de Economía Humana, Maldonado, Uruguay

### ARTICLE INFO

Available online xxxx

#### Keywords:

Acute lung injury  
Acute respiratory distress syndrome  
Sepsis  
Nitric oxide  
Free radicals  
Oxidative stress

### ABSTRACT

**Purpose:** During sepsis and mechanical ventilation oxidative stress is generated by endothelial and inflammatory lung cells. Our main objective was to study pulmonary •NO (nitric oxide) production and nitroxidative stress in mechanically-ventilated septic patients.

**Methods:** We study 69 mechanically ventilated patients, 36 with sepsis and 33 without sepsis within the first 48 h of ICU admission compared with 33 mechanically ventilated patients without sepsis (MV) plus eight operating room patients without lung disease served as control healthy group (ORCG). Nitrite plus nitrate (NO<sub>x</sub><sup>-</sup>), 3-nitrotyrosine and malondialdehyde (MDA) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were analyzed.

**Results:** BALF NO<sub>x</sub><sup>-</sup>, BALF 3-nitrotyrosine, BALF MDA, and plasma NO<sub>x</sub><sup>-</sup> were higher in the Sepsis than in MV patients (all  $p < .05$ ). Both SG and MV patients had higher BALF NO<sub>x</sub><sup>-</sup> than the healthy control group ( $p < .001$ ). In the Sepsis patients, the ICU non-survivors had higher levels of BALF NO<sub>x</sub><sup>-</sup> than ICU survivors 80(70–127) μM versus 31(15–47) μM,  $p < .001$ .

**Conclusions:** We conclude that during early phases of sepsis there is an enhanced lung nitroxidative stress due to an increase of •NO production leading to secondary •NO-derived oxidants, which promote protein nitration and lipid peroxidation.

© 2019 Published by Elsevier Inc.

**Abbreviations:** APACHE II, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation syndrome; ARDS, acute respiratory distress syndrome; AUC, area under the curve; BAL, bronchoalveolar lavage; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; FIO<sub>2</sub>, fraction of inspired oxygen; CO<sub>3</sub>, carbonate radical; CVP, central venous pressure; CI, confidence interval; ELISA, enzyme linked immunoadsorbent assay; HPLC, high pressure liquid chromatography; ICU, intensive care unit; LISS, lung injury severity score; MODS, multiple organ dysfunction score; NO<sub>x</sub><sup>-</sup>, nitrite plus nitrate; •NO, nitric oxide; •NO<sub>2</sub>, nitrogen dioxide; NOS, nitric oxide synthase; MDA, malondialdehyde; MV, mechanical ventilation; nm, nanomolar; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, superoxide radical; •OH, hydroxyl radical; ONOO<sup>-</sup>, peroxynitrite; ORCG, operating room control group; PAR, pressure adjusted heart rate ratio; PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, partial pressure of oxygen/fraction of inspired oxygen; PEEP, positive end expiratory pressure; ROC, receiver operator curve; SG, sepsis group.

\* Corresponding author at: Departamento de Emergencia, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, 11400 Montevideo, Uruguay.

E-mail addresses: [jgorrasi@hc.edu.uy](mailto:jgorrasi@hc.edu.uy) (J. Gorrasi), [hbotti@pasteur.edu.uy](mailto:hbotti@pasteur.edu.uy) (H. Botti), [batthyany@pasteur.edu.uy](mailto:batthyany@pasteur.edu.uy) (C. Batthyany), [naviliat@fmed.edu.uy](mailto:naviliat@fmed.edu.uy) (M. Naviliat), [ebarrios@fmed.edu.uy](mailto:ebarrios@fmed.edu.uy) (E. Barrios), [hcorrea@clae.h.edu.uy](mailto:hcorrea@clae.h.edu.uy) (H. Correa), [rradi@fmed.edu.uy](mailto:rradi@fmed.edu.uy) (R. Radi).

† Deceased

### 1. Introduction

The sepsis mortality rate in hospitals and intensive care units (ICUs) is within a range of 20–50% [1,2]. Lung involvement during sepsis is characterized by an inflammatory response accompanied by edema, cellular infiltration, and pulmonary hypertension [3]. Inflammatory cytokines such as tumor necrosis alpha, interferon gamma, interleukins and lipopolysaccharide activate immune cells for the production of reactive oxygen species, mainly superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), which in turn acts as a precursor of yet more powerful oxidants such as hydrogen peroxide and hydroxyl radical [4,5]. In addition, there is a systemic overproduction of •NO (nitric oxide), mostly derived from inducible nitric oxide synthase during sepsis leading to pathological peripheral vasodilation and systemic tissue injury [6,7]. The unusual high levels of •NO achieved in this pathological state will favor its reaction with O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (a diffusion-controlled reaction [8]) yielding peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) a powerful oxidizing and nitrating agent leading to nitroxidative stress [8,9]. Accumulation of nitrotyrosine reflects oxidative stress due to

nitric oxide-derived oxidants, a process called nitrooxidative stress [10]. Sepsis-induced lung injury is a clinically relevant finding in patients with or at risk of sepsis [11]. Increase production of •NO or its derived metabolites in pulmonary edema fluid [12] have been reported in acute respiratory distress syndrome (ARDS) acute lung injury and in the development of lung insult during sepsis [13]. Oxygen-derived free radical damage to lipids results in lipid peroxidation in the diseased lungs. In this regard, malondialdehyde (MDA) (a product of lipid peroxidation), has been used as biomarker of free radical-mediated damage in critically ill and/or pulmonary injured patients [14]. Most of the injurious effects of •NO have been attributed to ONOO<sup>-</sup>, given that this oxidant can nitrate tyrosine residues and [15,16] nitrated proteins have been found in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and plasma of patients with ARDS [12]. •NO and its derived metabolites have been detected in the lung of experimental septic animals and human patients and proposed to act as biomarkers of sepsis diagnosis and prognosis [17,18].

It is known that •NO and superoxide production are stimulated by inflammatory mediators in sepsis and from various physical stimuli induced by mechanical ventilation [19]. It has been reported that ARDS is associated with nitrooxidative stress [12]. It is not known if early high levels of lung and plasma Nitrooxidative stress could be associated with ICU evolution in septic mechanically-ventilated patients without severe lung injury. Nitrooxidative stress may begin in the early phases of sepsis when there was not severe lung injury and gas exchange impairment. We hypothesized that this mechanism could begin very early in septic patients before severe lung injury develops. In addition, we also investigated whether lung nitrooxidative stress is associated with the ICU mortality in mechanically ventilated patients.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Design

A convenience sample of critically ill patients was included after ICU admission. Exposure was sepsis, our main outcome variable was ICU mortality. Blood and BALF samples were obtained after study patient inclusion.

Setting. Ten bed Critical care unit at University Hospital.

Participants. Critical care patients admitted to intensive care unit.

The present study was performed with the approval by the Institutional Review Board and the Bioethics Committee of the Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República and in accordance to the Helsinki declaration about ethical principles of medical investigation on human subjects. Family members, relatives or volunteers signed informed consent.

### 2.2. Septic patients

Septic patients ( $n = 36$ ) were included during the first 48 h of ICU admission. Sepsis was defined according to the American European Consensus Criteria [20]. The severity of illness was evaluated by the APACHE II score [21]. Multiple organ failure (MOF) and Multiple organ dysfunction syndrome was evaluated by Multiple Organ Dysfunction Score (MODS) [2]. Lung injury was assessed by the American European Consensus Committee criteria [22], Berlin definition [23], and by the Murray Lung Injury severity score (LISS) [24]. All patients were ventilated and sedated.

Patients were excluded if they met one or more of the following criteria: pregnancy, long-lasting resuscitation, life-threatening arrhythmias, acute myocardial infarction with <48 h of evolution, bleeding disorder and refusal to participate.  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$  was an exclusion criterion for the bronchoalveolar lavage (BAL) procedure.

### 2.3. Mechanical ventilated patients

Patients undergoing mechanical ventilation (MV group) ( $n = 33$ ) for <70 h, without sepsis or ARDS were chosen as the mechanical ventilation control group. BAL procedure was performed after study inclusion. All ventilator parameters were recorded from ventilator readings.

### 2.4. Operating room control group

Blood and BALF samples were taken from 8 patients without pulmonary disease in the operating room after the induction of anesthesia.

### 2.5. Bronchoalveolar lavage protocol

BALF from septic patients was obtained within 48 h after ICU admission. All patients were sedated and pre oxygenated for 10 min before the BAL procedure ( $\text{FIO}_2 = 1.0$ ). Briefly, an indwelling catheter was inserted through the endotracheal tube until a wedged position was reached, afterwards 100 mL of normal saline solution divided in five aliquots were injected, after 20 s each aliquot was aspirated then collected and frozen for further analysis.

Variables. We measured clinical and physiologic variables; biochemical variables related to nitric oxide production were measured in plasma and BALF.

#### 2.5.1. Sampling protocol

Blood sampling was contemporary to BALF sampling. BALF sampling was done within 48 h of ICU admission. Sampling time was 24 (12–43) hours in sepsis and 12(6–48) hours in mechanical ventilation group,  $p$  non-significant. There were no statistical difference in sampling time between survivors and non survivors, 24(12–44) hours versus 24(12–41) hours in sepsis group and 12(6–48) hours versus 12(7–30) hours in mechanical ventilation group.

### 2.6. Nitrite and nitrate assay

Nitrite and nitrate was measured by the Griess/vanadium chloride reduction method [25].

### 2.7. Malondialdehyde assay

MDA was measured by using a modified method adapted from [26]. MDA was detected by isocratic elution in reverse phase HPLC equipped with a fluorescent detector set at  $\lambda_{\text{ex}} 532 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} 553 \text{ nm}$ .

### 2.8. Protein 3-nitrotyrosine quantification

Protein bound 3-nitrotyrosine was measured by the ELISA method [27]. 3-nitrotyrosine concentration was normalized to protein concentration and expressed as pmol/mg of protein.

### 2.9. Statistical analysis

Values were expressed as medians, 25th and 75th percentile. Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test were used to compare variables. Categorical variables were compared with the Chi-square test. After BALF  $\text{NO}_x^-$  results were obtained the cutoff value for BALF  $\text{NO}_x^-$  at study admission was selected by constructing receiver operating curves (ROC) for ICU mortality. The value of BALF  $\text{NO}_x^-$  corresponding to the highest sensitivity plus specificity value was chosen as the cutoff point. Survival analysis was done by transforming BALF  $\text{NO}_x^-$  values into a dichotomous variable with BALF  $\text{NO}_x^-$  cutoff greater or equal to 53  $\mu\text{M}$ .

The hazard ratio of ICU mortality was evaluated by using a logistic regression model including variables that were significant in the

univariate analysis. Data were analyzed with SPSS 15.0 version. A  $p < .05$  was considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Participants

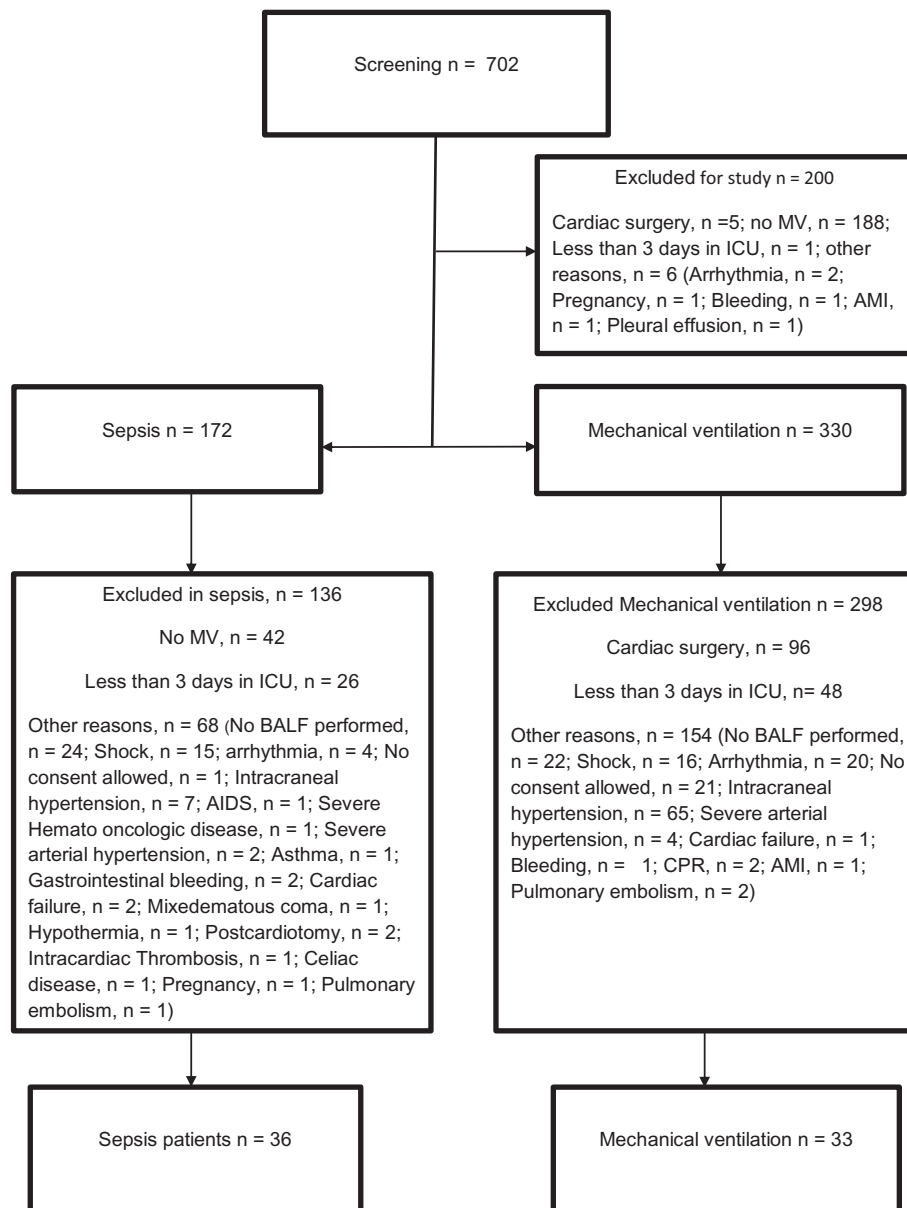
Septic patients ( $n = 36$ ) were included between September 2000 and June 2004. Flow diagram for inclusion and exclusion of patients is depicted in Fig. 1. Patient characteristics are depicted in Tables 1 and 2. Sepsis origin in SG was depicted in Table 1. Reasons for mechanical ventilation in sepsis group were: respiratory failure ( $n = 11$ ), shock ( $n = 9$ ), both respiratory failure and shock ( $n = 8$ ), decrease of the level of consciousness ( $n = 4$ ), multiorgan failure ( $n = 1$ ), metabolic acidosis ( $n = 1$ ). Diagnosis in MV group was: trauma ( $n = 21$ ), postoperative ( $n = 6$ ), stroke ( $n = 4$ ), hypothyroidism ( $n = 1$ ), status epilepticus ( $n = 1$ ). ICU mortality was 44% and 18% in the SG and in the MV group, respectively.

**Table 1**  
Sources of sepsis in Sepsis patients.

	n (%)
Peritoneal	13 (36.11)
Respiratory	13 (36.11)
Endovascular	3 (8.33)
Mediastinal	1 (2.78)
Pancreatic abscess	1 (2.78)
Enteric	1 (2.78)
Urinary	1 (2.78)
Soft tissue infection	1 (2.78)
Cholecystitis	1 (2.78)
Unknown source of infection	1 (2.78)

#### 3.2. Clinical descriptive variables at admission to the ICU

The clinical variables at study admission on the SG and MV groups are shown in Table 1. APACHE II, MODS and LIS were higher in the SG



**Fig. 1.** Patient inclusion and exclusion flow diagram. AMI, acute myocardial infarction; AIDS, acquired immune deficiency syndrome; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; CPR, cardiopulmonary resuscitation; ICU, intensive care unit; MV, mechanical ventilation

**Table 2**  
Clinical variables.

	All patients			Sepsis patients			MV patients			p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	p <sup>c</sup>	p <sup>d</sup>
	All patients (n = 69)	Survivors (n = 47)	Non survivors (n = 22)	All sepsis (n = 36)	Survivors (n = 20)	Non survivors (n = 16)	All MV (n = 33)	Survivors (n = 28)	Non survivors (n = 5)				
Age (years)	53 (31–67)	48 (29–63)	58 (45–69)	57 (40–72)	55 (22–69)	62 (52–74)	45 (31–61)	43 (30–61)	51 (32–62)	NS	NS	NS	0.027
APACHE II	14 (12–19)	12 (9–16)	18 (12–26)	16 (13–25)	15 (12–18)	23 (15–28)	11 (9–13)	10 (8–13)	12 (10–18)	<0.001	0.023	NS	0.001
MODS	5.00 (2.00–6.25)	2.00 (2.00–5.00)	5.00 (3.00–8.25)	5.00 (3.25–7.75)	5.00 (2.25–6.75)	7.00 (5.00–9.75)	2.00 (1.00–3.00)	2.00 (1.00–3.00)	3.00 (2.50–5.00)	<0.001	NS	NS	<0.001
SOFA	4.00 (2.00–5.00)	2.00 (1.00–5.00)	5.00 (2.00–7.00)	5.00 (4.00–6.75)	5.00 (3.25–5.00)	5.00 (5.00–7.75)	1.00 (1.00–2.00)	1.00 (1.00–2.00)	1.50 (1.00–2.75)	<0.001	NS	NS	0.001
LISS	1.50 (1.00–2.00)	1.25 (0.75–1.75)	1.62 (1.00–2.06)	1.87 (1.50–2.25)	1.75 (1.30–2.20)	2.00 (1.50–2.25)	1.00 (0.62–1.25)	1.00 (0.50–1.25)	0.87 (0.69–1.06)	<0.001	NS	NS	NS
Shock (%)	33	23	55	47	62	35	18	33	15	0.011	NS	NS	0.011
ICU length of stay(days)	18 (9–24)	16 (9–24)	18 (6–25)	21 (14–29)	23 (15–35)	19 (8–26)	13 (7–21)	13 (8–21)	8 (5–26)	0.005	NS	NS	NS
VFD(days)	16 (8–21)	17 (9–21)	15 (7–22)	13 (6–20)	13 (6–20)	12 (7–21)	19 (11–23)	18 (11–23)	22 (5–23)	0.041	NS	NS	NS
PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub>	366 (297–459)	383 (306–500)	340 (268–429)	340 (278–428)	375 (293–525)	297 (210–385)	420 (344–500)	400 (338–500)	429 (410–546)	0.001	NS	NS	NS
PEEP (cm of H <sub>2</sub> O)	9 (6–11)	9 (6–10)	10 (5–12)	10 (9–15)	10 (9–16)	10 (9–15)	8 (5–10)	8 (5–9)	7 (5–10)	<0.001	NS	NS	NS
MAP (mm Hg)	85 (80–91)	87 (79–94)	82 (80–90)	86 (80–98)	89 (81–98)	82 (79–95)	84 (78–90)	84 (78–90)	86 (79–90)	NS	NS	NS	NS
CVP (mm Hg)	11 (10–14)	11 (10–13)	13 (10–16)	13 (10–16)	12 (10–14)	15 (10–18)	10 (9–12)	10 (8–12)	12 (9–13)	0.003	NS	NS	0.044
PAR	13 (10–16)	11 (9–13)	14 (13–23)	14 (12–20)	13 (10–16)	19 (13–24)	11 (9–13)	11 (8.5–12)	12 (10–13)	<0.001	0.007	NS	0.001
Serum creatinine (mg/mL)	0.84 (0.70–1.00)	0.80 (0.70–1.00)	1.00 (0.80–1.75)	1.00 (0.77–2.20)	0.98 (0.60–2.06)	1.15 (0.80–2.34)	0.80 (0.70–1.00)	0.80 (0.70–0.90)	0.92 (0.78–1.00)	0.007	NS	NS	0.025
Arterial pH	7.39 (7.35–7.42)	7.40 (7.37–7.43)	7.38 (7.30–7.42)	7.37 (7.30–7.40)	7.37 (7.34–7.40)	7.37 (7.29–7.42)	7.40 (7.38–7.44)	7.40 (7.38–7.45)	7.40 (7.34–7.47)	0.002	NS	NS	NS

Values are given as median, 25th and 75th percentiles. Abbreviations and definitions: CVP, central venous pressure; ICU, intensive care unit; I and V, inotropics and vasopressors use; LISS, lung injury severity score; MAP, mean arterial pressure; MODS, multiple organ dysfunction score; MV, mechanical ventilation; PAR, pressure adjusted heart rate; SOFA, score of sequential organ failure assessment score;; V<sub>T</sub>/Kg, expired tidal volume divided by body weight; VFD, ventilator free days. All patients included sepsis and mechanical ventilation groups.

<sup>a</sup> For the comparison between sepsis group and MV group.

<sup>b</sup> Or the comparison between non survivors and survivors in sepsis group.

<sup>c</sup> For the comparison between non survivors and survivors in MV group.

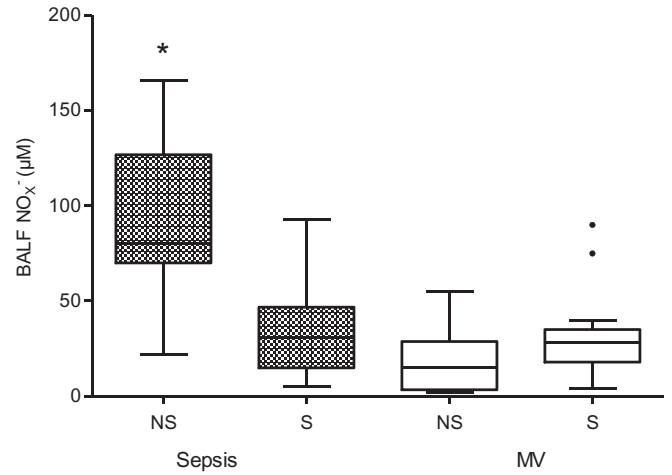
<sup>d</sup> For the comparison between non survivors and survivors in all patients.

**Table 3**  
Biochemical variables in relation to Intensive Care Unit mortality.

	All patients				Sepsis				Mechanical ventilation				ORCG (n = 8)	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	p <sup>c</sup>	p <sup>d</sup>	p <sup>e</sup>		
	All patients (n = 69)		Non survivors (n = 22)		All patients (n = 36)		Survivors (n = 20)		All patients (n = 33)		Survivors (n = 28)								Non survivors (n = 5)	
	Survivors (n = 47)	Non survivors (n = 22)	Survivors (n = 20)	Non survivors (n = 16)	Survivors (n = 20)	Non survivors (n = 16)	Survivors (n = 28)	Non survivors (n = 5)	Survivors (n = 28)	Non survivors (n = 5)	Survivors (n = 28)	Non survivors (n = 5)							Survivors (n = 28)	Non survivors (n = 5)
BALF NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> (μM)	30 (17–70)	70 (22–91)	31 (15–47)	80 (70–127)	27 (15–34)	28 (18–35)	15 (4–29)	4 (3–5)	0.001	<0.001	0.08	0.003	<0.001							
BALF NT (pmol/mg protein)	104 (32–240)	136 (36–282)	173 (32–787)	149 (33–329)	60 (29–175)	60 (29–174)	92 (33–286)		0.049	0.626	0.768	0.629								
BALF MDA (nM)	90 (26–191)	129 (53–208)	114 (11–212)	174 (85–232)	78 (26–100)	79 (26–108)	73 (17–86)		0.014	0.312	0.388	0.169								
Plasma NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> (μM)	97 (50–226)	94 (60–238)	130 (51–240)	156 (71–250)	54 (30–119)	52 (29–145)	60 (39–74)		0.001	0.962	0.737	0.331								

ORCG, operating room control group; MV, mechanical ventilation group. Values are given as median, 25th and 75th percentiles. All patients included sepsis and mechanical ventilation groups.

- <sup>a</sup> for the comparison between sepsis group and MV group.
- <sup>b</sup> for the comparison between non survivors and survivors in sepsis group.
- <sup>c</sup> for the comparison between non survivors and survivors in MV group.
- <sup>d</sup> comparison between non survivors and survivors in all patients.
- <sup>e</sup> for the comparison with ORCG.



**Fig. 2.** BALF NO<sub>x</sub><sup>-</sup> (bronchoalveolar lavage fluid nitrite plus nitrate) according to Intensive Care Unit mortality. MV, Mechanical ventilation; NS, non-survivors; S, survivors. \*, p < .05 versus survivors in sepsis group. Shaded bars denote patients with sepsis.

compared to the MV group (Table 2). CVP and PAR were higher in the SG than in MV group whereas arterial pH was lower in SG than in MV group. Ventilator variables are shown in Table 1. PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> ratio was lower in SG. Serum creatinine, PEEP and plateau pressure were higher in SG compared to MV. PAR score was found to be elevated in non-survivors compared to survivors on the SG.

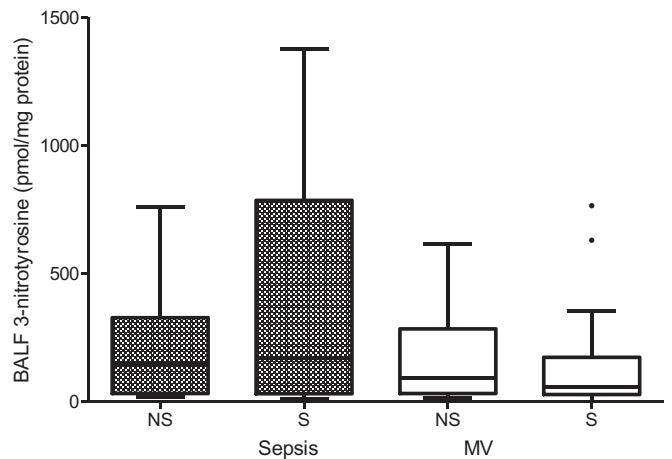
In the sepsis group we found bilateral infiltrates that were used for lung injury score. Accordingly, they have 2 (1–3) chest radiographs quadrants occupied.

### 3.3. Protein concentration in bronchoalveolar lavage fluid

BAL fluid protein concentration was 0.50 (0.17–1.28) mg/mL in sepsis patients versus 0.22 (0.07–1.16) mg/mL in mechanical ventilation group.

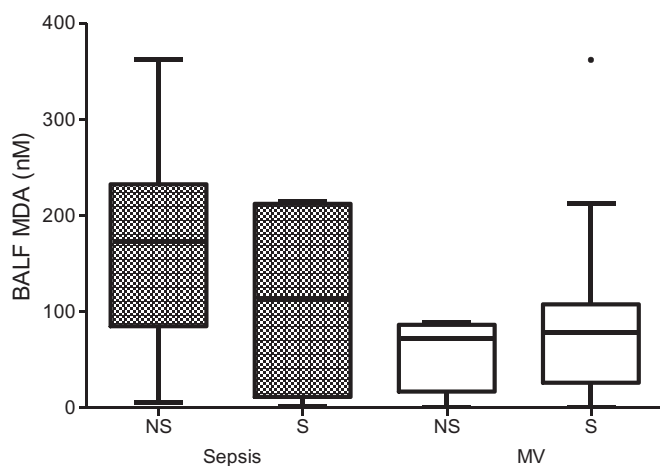
### 3.4. Evaluation of nitrooxidative damage to the injured lung

Nitrite plus nitrate (NO<sub>x</sub><sup>-</sup>) are end products of •NO and •NO-derived oxidants such as ONOO<sup>-</sup> that can be measured as surrogate markers in the BALF. We found higher levels of NO<sub>x</sub><sup>-</sup> in both groups of critical ill patients (SG and MV) than the control group (ORCG). Analysis of patients admitted to the ICU revealed that the SG had higher BALF NO<sub>x</sub><sup>-</sup> levels



**Fig. 3.** BALF 3-nitrotyrosine (bronchoalveolar lavage fluid 3-nitrotyrosine) according to Intensive Care Unit mortality. MV, Mechanical ventilation; NS, non-survivors; S, survivors. Shaded bars denote patients with sepsis.





**Fig. 4.** BALF MDA according to ICU mortality. MV, Mechanical ventilation; NS, non-survivors; S, survivors. Shaded bars denote patients with sepsis.

than the MV group 62 (21–88)  $\mu\text{M}$  versus 27 (15–34)  $\mu\text{M}$  respectively,  $p < .001$ . This result is in line with the expected increased on  $\bullet\text{NO}$  production observed during sepsis. Moreover, BALF  $\text{NO}_x^-$  levels were higher in septic non-survivors than in survivors, underscoring the association between nitrooxidative stress and the severity of the disease 80 (70–127)  $\mu\text{M}$  versus 31 (15–47)  $\mu\text{M}$ , respectively,  $p < .001$ ; Table 3 and Fig. 2).  $\bullet\text{NO}$  is not a potent oxidant itself but in the presence of  $\text{O}_2^{\bullet-}$  will give rise to  $\text{ONOO}^-$ , a principal cause of nitrooxidative damage.  $\text{ONOO}^-$  derived radicals such as  $\bullet\text{NO}_2$ ,  $\bullet\text{OH}$  and carbonate radical ( $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ), can initiate lipid peroxidation and nitration of protein bound and free tyrosine. We therefore evaluated MDA and 3-nitrotyrosine in BALF to evaluate nitrooxidative damage.

### 3.5. Protein 3-nitrotyrosine in bronchoalveolar lavage fluid

Both study groups (SG and MV) showed evidence of protein nitration in BALF (Table 3). BALF 3-nitrotyrosine was higher in SG than in MV group. There was no statistical difference between survivors and non-survivors in any of the groups analyzed (Table 3 and Fig. 3). 3-nitrotyrosine from ORCG was not available.

### 3.6. Malondialdehyde in bronchoalveolar lavage fluid

MDA in BALF was determined in SG and in MV group. Both sepsis and MV groups shown evidence of lipid peroxidation (Table 3). BALF MDA was higher in SG compared to MV. There was no difference on MDA levels between survivors and non-survivors in both groups (Table 3 and Fig. 4).

### 3.7. Clinical course of patients in sepsis group and nitrooxidative stress

Regarding patients evolution in sepsis group we found that: 20 patients survived and 16 patients died, 9 of out 16 died with MOF and 7 of out 16 died with ARDS. Reasons of death were classified according to the presence of organ failure or ARDS as main reason of death. We found that in sepsis group 9 patients died with organ failure and 7 patients died with ARDS. Furthermore, although BALF  $\text{NO}_x^-$  was high in

non survivors we found no difference in BALF  $\text{NO}_x^-$  concentration.  $\text{NO}_x^-$  in BALF was 80 (70–142)  $\mu\text{M}$  in patients that die with organ failure and 72 (56–90)  $\mu\text{M}$  in patients that die with ARDS,  $p = 0.408$ . Patients that died with organ failure and patients that died with ARDS had high levels of pulmonary  $\text{NO}_x^-$ . Nevertheless, there were no differences in lung  $\text{NO}_x^-$  production between ARDS and organ failure patients.

In our study population high nitrooxidative stress was not significantly related to lung injury worsening. We use the Berlin definition of ARDS (no ARDS, mild ARDS, moderate ARDS, and severe ARDS) to characterize severity of lung involvement in sepsis group. Then we compared the initial Berlin score with the last value of Berlin score obtained in each septic patient. By comparing initial against last value of Berlin definition severity, we classified patient evolution as improvement, worsening or no change in Berlin definition severity status. We separate them based on initial BALF  $\text{NO}_x^-$  levels (high or low). We found that in patients with no change in Berlin status ( $n = 25$ ) there were 14 and 11 patients with low and high levels of BALF  $\text{NO}_x^-$ ; in patients with improvement in Berlin status ( $n = 7$ ) there were 5 and 2 patients with low and high levels of BALF  $\text{NO}_x^-$ ; in patients with worsening in Berlin status ( $n = 4$ ) there were 1 and 3 patients with low and high levels of BALF  $\text{NO}_x^-$ ; respectively. As a result no clear differences in nitrooxidative stress levels between Berlin severity status evolutions were observed.

### 3.8. Survival analysis according to BALF $\text{NO}_x^-$

ICU mortality was 32%, whereas ICU mortality was 44% in sepsis and 18% in mechanical ventilation without sepsis.

We performed survival analysis in all patients (sepsis plus mechanical ventilation,  $n = 69$ ) AUC for ROC analysis was 0.72 (95% CI: 0.57 to 0.87) for BALF  $\text{NO}_x^-$ . We found that at the sensitivity of BALF  $\text{NO}_x^-$  in all patients for ICU mortality was 73% (95% CI: 50% to 89%), the specificity was 8% (95% CI: 74% to 95%), the positive likelihood ratio was 6 (95% CI: 3 to 13), the negative likelihood ratio was 0.31 (95% CI: 0.16 to 0.62), positive predictive value was 73% (95% CI: 50% to 89%), negative predictive value was 87% (95% CI: 74% to 95%). In the multivariate analysis after correcting for APACHE II, BALF  $\text{NO}_x^- \geq 53 \mu\text{M}$  remained as significant prognostic variable (Table 4).

In sepsis patients AUC for ROC analysis was 0.84 (95% CI: 0.71 to 0.99) for BALF  $\text{NO}_x^-$ . Septic patients with BALF  $\text{NO}_x^-$  concentration equal or higher than 53  $\mu\text{M}$  had an ICU mortality of 79%, whereas patients with BALF  $\text{NO}_x^- < 53 \mu\text{M}$  had an ICU mortality of 6% ( $p < .05$ ). At this cutoff the sensitivity of BALF  $\text{NO}_x^-$  in sepsis patients for ICU mortality was 87% (95% CI: 62% to 98%), the specificity was 80% (95% CI: 56% to 94%), the positive likelihood ratio was 4 (95% CI: 2 to 11), the negative likelihood ratio was 0.16 (95% CI: 0.04 to 0.58), positive predictive value was 78% (95% CI: 52% to 93%), and negative predictive value was 89% (95% CI: 65% to 98%).

### 3.9. Nitrite and nitrate in plasma

Nitrite plus nitrate ( $\text{NO}_x^-$ ) concentration in plasma was determined in SG ( $n = 36$ ), MV group ( $n = 24$ ) and ORCG patients. Plasma  $\text{NO}_x^-$  on both SG and MV groups were elevated when compared to ORCG (Table 3). Plasma  $\text{NO}_x^-$  was higher in SG compared to MV. There were no differences in plasma  $\text{NO}_x^-$  concentration between non-survivors and survivors in any of the groups.

## 4. Discussion

In mechanically ventilated septic patients we observed very early high nitrooxidative stress production and a relationship between pulmonary  $\bullet\text{NO}$ -derived oxidants, and patient outcome. We found that nitrooxidative stress begins early before severe lung injury develops. Besides, we found that early BALF  $\text{NO}_x^-$  concentration is elevated both in patients who get worse lung injury and in patients who did not get worse lung injury. Patients that die with ARDS or with organ failure had

**Table 4**  
Logistic Regression for ICU mortality.

Variable	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR (95% C.I.)
APACHE II	0.105	0.055	3.585	1	0.058	1.11 (0.99 – 1.24)
BALF $\text{NO}_x^-$	2.424	0.685	12.531	1	0.0001	11.30 (2.95 – 43.21)
Constant	-3.326	0.913	13.270	1	0.0001	0.036

elevated BALF  $\text{NO}_x^-$  concentration; this was related to lung and whole-body persistent nitroxidative stimulus. Sepsis-induced lung inflammation and injury are associated with overproduction of  $\bullet\text{NO}$  in a pro-inflammatory environment such as the lungs, where an increase in formation of reactive oxygen species, in particular  $\text{O}_2^{\bullet-}$  is expected [28].  $\bullet\text{NO}$  production and oxidative stress have been described in various experimental animal models of sepsis [29] and acute lung injury/ARDS [7]. In humans, increased pulmonary  $\bullet\text{NO}$  production has been reported during sepsis [30], severe sepsis [31], septic shock [32] and acute respiratory distress syndrome [33]. An inflammatory and oxidative mechanism triggered by cytokines has been proposed to explain the increased lung and systemic  $\bullet\text{NO}$  concentration in those patients [34]. Zhu and colleagues reported elevated  $\text{NO}_x^-$  in pulmonary edema fluid from 34 patients with acute lung injury/ARDS (38% with sepsis) versus 20 patients with hydrostatic pulmonary edema. A persistent elevation on BALF  $\text{NO}_x^-$  in ARDS patients of multiple origins has been reported in previous work, in which BALF  $\text{NO}_x^-$  levels were higher in non survivors evaluated at days 7 and 21 [12]. We found that the increase on  $\text{NO}_x^-$  in the BALF occurs early in ventilated septic patients independent of the presence of primary lung injury. We found a predictive value of BALF  $\text{NO}_x^-$  in a homogeneous population of septic patients.

Since mechanical ventilation can induce biotrauma, we could speculate that NOS activity would be elevated in sepsis and in mechanical ventilation groups. Inflammatory stimulus from sepsis increases NOS expression further, as a result nitrite and nitrate concentrations in plasma and in BAL samples are higher in sepsis than in mechanical ventilation group. Sepsis-induced lung NOS expression together inflammatory cytokines have been described in the lungs of ARDS patients following sepsis [18].

Oxidative stress is an imbalance between oxidants and antioxidants on a cellular or individual level. The entire basis of the biomarker phenomenon is the measurement of a compound that directly reflects certain biological events related to the pathogenesis of a disease, in the case of MDA, lipid oxidation is the biological event. Several hypotheses describing the formation of MDA in vivo have been proposed. The mechanism is thought to involve formation of prostaglandin-like endoperoxides from polyunsaturated fatty acids with two or more double bonds [35] or alternatively through hydroperoxide formation and cleavage of polyunsaturated fatty acids [36]. Other minor sources exist such as by-products of free radical formation. The use of the Thiobarbituric acid assay to measure MDA can give confounding results due to the lack of specificity in complex biological mixtures, as several products other than MDA can yield adducts with similar optical properties. In our study we used an HPLC based method with fluorescence detection, which significantly improves the specificity of the MDA measurement as previously reported [37]. MDA in BALF has been reported as a biomarker of increased lung oxidative injury and lipid peroxidation [38]. In our study we found that septic patients have higher MDA production than the MV group. Lung nitroxidative stress during sepsis is demonstrated by the augmented production of  $\text{NO}_x^-$ , 3-nitrotyrosine and MDA in the septic group. Although some degree of nitroxidative damage was also observed in the MV group, we showed that the septic state itself is a stronger inducer of  $\bullet\text{NO}$  and its byproducts, which are associated with patient outcome.

Disparities in mortality between SG and MV are due to organ failure. In the SG, an increase on APACHE II, PAR score and BALF  $\text{NO}_x^-$  was found in ICU non-survivors. When we analyzed those variables in a multivariate model that included BALF  $\text{NO}_x^-$  as dichotomous variable, we found that BALF  $\text{NO}_x^-$  remained as a significant predictive variable for ICU mortality. This finding reflects pulmonary high inflammatory state that occurs in sepsis patients. We cannot elucidate if this is the expression of local production or if it is the result of systemic nitric oxide production. Moreover, it does not imply causality since it is a lung biomarker expression.

The combination of additional biomarkers may increase its predictive accuracy. However, in the univariate analysis for mortality, BALF

nitrotyrosine, BALF malondialdehyde and plasma malondialdehyde were not associated with poor prognosis in sepsis patients. In the ROC analysis BALF  $\text{NO}_x^-$  had an area under the curve for mortality of 0.82, whereas nitrotyrosine and malondialdehyde and plasma  $\text{NO}_x^-$  were close to the threshold of chance. Therefore, we included only BALF  $\text{NO}_x^-$  together with APACHE II score in the regression analysis. As we pointed out above this is probably due to the small sample size of this pilot study. From a pathophysiological point of view it is expected that nitroxidative stress would be associated with elevated nitrotyrosine (protein nitration) and MDA (lipidperoxidation). On the other hand, it would be possible to have a type I error due to small sample size. To confirm that combination of biomarkers may increase predictive accuracy we will need a population sample calculated for each biomarker in order to avoid errors. The association of  $\text{NO}_x^-$  and mortality should be analyzed in a larger population sample, taken into account different predictive variables and related covariates.

Previous studies have shown that alveolar  $\bullet\text{NO}$  and therefore,  $\text{NO}_x^-$  levels were higher in lung fluid than in plasma of patients with lung edema [33]. In the present study the measured levels of  $\text{NO}_x^-$  in lung were lower in the BALF than in plasma. BALF was used as the source for lung  $\text{NO}_x^-$  determination and the procedure leads to a dilution factor of  $\approx 100$ -fold [39]. Since we did not measure  $\text{NO}_x^-$  in other regions we could not argue that all BALF  $\text{NO}_x^-$  measured is produced at the lung. Increased  $\bullet\text{NO}$  production and/or derived oxidants in the lungs hampers the clearance of pulmonary edema, inflammatory solutes and is accompanied by the presence of nitrated proteins [33].

BAL fluid protein concentration was 0.50 (0.17–1.28) mg/mL in sepsis versus 0.22 (0.07–1.16) mg/mL in mechanical ventilation, *p* non-significant. Cederfur et al. reported that BALF protein concentration in healthy subjects was 0.04 mg/mL [40]. In our study BALF protein concentration in both sepsis and mechanical ventilation was higher than reported BALF protein concentration in normal subjects which is consistent with pulmonary inflammatory response in both groups. It has been reported that mechanical ventilation may induce a proinflammatory cytokine release that triggers lung injury [41]. We did not measure other specific proinflammatory markers that could add very important information that links NO production with lung inflammation. Kobayashi et al. reported high levels of NOS expression and NO derived products and proinflammatory cytokines in BALF from ARDS patients following sepsis [18].

There are limitations to this work. First, delayed analysis after sampling time in relation with nitrotyrosine analysis might induce analytical pitfalls. Therefore, biological samples were frozen after collection and analyzed quickly. Thus, the actual data was obtained right after sample collection. Covalent Protein-Nitrotyrosine binding is stable after sample collection. Analytical methods for nitrotyrosine detection in biological samples have been reviewed. We used an immunochemical analysis for nitrotyrosine that could be semi-quantitative, this method has been validated by our group and others [27]. Since we used the same method for both groups there were no analytical bias. We could speculate that absolute values of nitrotyrosine may be different with other method, for example mass spectrometry-based. This biochemical analytical issue is not discussed in this paper, but we recognize that is still matter of debate, recently reviewed by our group [42]. Second, nitrotyrosine and malondialdehyde in ORCC BALF was not measured. Ozaras et al. reported BALF MDA concentration of 6 nanomolar in healthy control subjects measured with Richard et al. method [43]. Jafari et al. using the method of Ohkawa found  $0.63 \pm 0.067$  nmol/mg protein concentration of MDA in BALF from healthy subjects [44,45]. On the other hand, De Andrade et al. reported ELISA measured Protein nitrotyrosine levels in BALF from healthy subjects of 28 (26–33) pmol/mg protein [46]. As a result we found higher levels of both nitrotyrosine and MDA in BALF than normal values reported elsewhere.  $\text{NO}_x^-$  values were found to be higher than in previous studies [33]. This could be due in part to the method used to analyze BALF  $\text{NO}_x^-$ , which utilizes the chemical reduction of nitrate to nitrite increasing the sensitivity of



the Griess method. The values of  $\text{NO}_x^-$  found in the ORCC recapitulate well to previous reports in control patients [33,39] where the formation of  $\text{ONOO}^-$  is expected to be low. Third, the present clinical study was performed in the ICU; the role of  $\text{NO}_x^-$  at early stages of sepsis prior to admission deserves further investigation. Since we did not measure biomarkers of lung injury we could not assume that lung nitroxidative stress is associated with lung injury. Fourth, similarly, the contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in lung protein tyrosine nitration should be studied in future work. We used ELISA method for nitrotyrosine determination, a method with low specificity due to others mechanisms instead of peroxyxynitrite for protein nitration. We consider our results to be preliminary and hypothesis generating. Finally, this pilot study is not a large sample size population study and confounding factors that contribute to mortality,  $\bullet\text{NO}$  production and oxidative stress could be concealed.

Nitroxidative stress following sepsis suggests that nitric oxide and related oxidants and proinflammatory cytokines might play a pivotal role in the pathogenesis of acute lung injury and be useful for monitoring sepsis-related organ failure. If predictive value of lung nitroxidative stress is confirmed in larger studies it may be useful at very early phases of sepsis to assess prognosis. Biomarkers also have the potential to guide ventilator management, and could be used to assess for ongoing ventilator-induced lung injury and to guide ventilator management in order to minimize lung strain.

## 5. Conclusions

In summary, our findings support the conclusion that pulmonary  $\bullet\text{NO}$  production and  $\bullet\text{NO}$ -derived oxidants are elevated very early before severe lung develops in sepsis and in mechanically-ventilated patients. Early  $\text{NO}_x^-$  production is associated with ICU outcome in patients with sepsis who received mechanical ventilation, reinforcing the pathophysiological deleterious effect of nitroxidative stress in the lungs. Further research about pulmonary nitroxidative stress during early stages of human sepsis is warranted.

## Key messages

- Sepsis and mechanical ventilation in patients without severe lung injury are associated with early lung nitric oxide overproduction leading to nitroxidative stress
- BALF  $\text{NO}_x^-$  at admission may be related to ICU mortality

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

JG, contributed to study design, data collection, data analysis, drafting and revision of the manuscript, and approval of the final manuscript and served as principal author. GP, contributed to data collection, data analysis, drafting and revision of the manuscript, and approval of the final manuscript. HB, contributed to data collection, revision of the manuscript, and approval of the final manuscript. MN, contributed to data collection, revision of the manuscript, and approval of the final manuscript. EB, contributed data analysis, revision of the manuscript, and approval of the final manuscript. HC, contributed to study design, data analysis, revision of the manuscript and approved the final version of the manuscript. RR, contributed to study design, data analysis, revision of the manuscript and approved the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Authors' information

JG, Departamento de Emergencia, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina. Universidad de la República. Centro de Tratamiento Intensivo, Hospital de Clínicas y Center for Free Radical and Biomedical Research (CEINBIO), Facultad de Medicina. Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay. HB, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. CB, Institut Pasteur de Montevideo. 11400 Montevideo, Uruguay. MN, Cátedra de Reumatología. Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11600 Montevideo. Uruguay. EB, Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay.

HC, Facultad de Medicina. Centro Latinoamericano de Economía Humana (CLAEH). Prado y Salt Lake, Parada 16 Av. Roosevelt, Maldonado, Uruguay. RR, Departamento de Bioquímica y Center for Free Radical and Biomedical Research (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay.

## Acknowledgements

The work was supported by grants from CSIC\_Universidad de la República and Espacio Interdisciplinario\_Universidad de la República to Rafael Radi, M.D., Ph.D.

José Gorrasi, M.D., was partially supported by a fellowship from the Programa para la Investigación Biomédica (PROINBIO, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay) and CSIC\_Universidad de la República, Uruguay.

None of the authors has any conflict of interest.

## Acknowledgment

The authors are very grateful to Dr. Beatriz Noya (Departamento de Anestesiología, Hospital de Clínicas) for her assistance in BALF collection in the operating room.

## References

- [1] Vincent JL, Abraham E, Annane D, Bernard G, Rivers E, Van den Berghe G. Reducing mortality in sepsis: new directions. *Crit Care* 2002;6(Suppl. 3):S1–18.
- [2] Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med* 1995;23(10):1638–52.
- [3] Fein AM, Calalang-Colucci MG. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. *Crit Care Clin* 2000;16(2):289–317.
- [4] Wu F, Cepinskas G, Wilson JX, Tynl K. Nitric oxide attenuates but superoxide enhances iNOS expression in endotoxin- and IFN $\gamma$ -stimulated skeletal muscle endothelial cells. *Microcirculation* 2001;8(6):415–25.
- [5] Khadour FH, Panas D, Ferdinandy P, Schulze C, Csont T, Lalu MM, et al. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(3):H1108–15.
- [6] Shanley TP, Zhao B, Macariola DR, Denenberg A, Salzman AL, Ward PA. Role of nitric oxide in acute lung inflammation: lessons learned from the inducible nitric oxide synthase knockout mouse. *Crit Care Med* 2002;30(9):1960–8.
- [7] Hinder F, Meyer J, Booke M, Ehardt JS, Salisbury JR, Traber LD, et al. Endogenous nitric oxide and the pulmonary microvasculature in healthy sheep and during systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(5 Pt 1):1542–9.
- [8] Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxyxynitrite. *J Biol Chem* 2000;275(42):32460–6.
- [9] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxyxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271(5 Pt 1):C1424–37.
- [10] Peluffo G, Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res* 2007;75(2):291–302.
- [11] Zilberg MD, Epstein S. Acute lung injury in the medical ICU. Comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1159–64.
- [12] Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT, Myles C, Zhu S, Goodman RB, et al. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(2):503–10.
- [13] Ochoa JB, Udekwo AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 1991;214(5):621–6.
- [14] Mishra V, Baines M, Wenstone R, Shenkin A. Markers of oxidative damage, antioxidant status and clinical outcome in critically ill patients. *Ann Clin Biochem* 2005;42(Pt 4):269–76.
- [15] Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxyxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 2001;30(5):463–88.

- [16] 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(7):4244–50.
- [17] Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(4):1250–4.
- [18] Kobayashi A, Hashimoto S, Kooguchi K, Kitamura Y, Onodera H, Urata Y, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and inflammatory cytokines in alveolar macrophages of ARDS following sepsis. *Chest* 1998;113(6):1632–9.
- [19] Frank JA, Pittet JF, Lee H, Godzich M, Matthay MA. High tidal volume ventilation induces NOS2 and impairs cAMP-dependent air space fluid clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284(5):L791–8.
- [20] Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med* 1992;20(6):724–6.
- [21] Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13(10):818–29.
- [22] Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. Report of the American-European Consensus conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Consensus Committee. *J Crit Care* 1994;9(1):72–81.
- [23] ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012;307(23):2526–33.
- [24] Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1988;138(3):720–3.
- [25] Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001;5(1):62–71.
- [26] Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A. High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr* 1992;577(1):9–18.
- [27] Naviliat M, Gualco G, Cayota A, Radi R. Protein 3-nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(12):1825–34.
- [28] Wang Le F, Patel M, Razavi HM, Weicker S, Joseph MG, McCormack DG, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in pulmonary microvascular protein leak in murine sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(12):1634–9.
- [29] Matsuo N. The role of intrapulmonary nitric oxide generation in the development of adult respiratory distress syndrome. *Surg Today* 1999;29:1068–74.
- [30] Wong HR, Carcillo JA, Burckart G, Shah N, Janosky JE. Increased serum nitrite and nitrate concentrations in children with the sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1995;23(5):835–42.
- [31] Groeneveld PH, Kwappenberg KM, Langermans JA, Nibbering PH, Curtis L. Nitric oxide (NO) production correlates with renal insufficiency and multiple organ dysfunction syndrome in severe sepsis. *Intensive Care Med* 1996;22(11):1197–202.
- [32] Avontuur JA, Stam TC, Jongen-Lavrencic M, van Amsterdam JG, Eggermont AM, Bruining HA. Effect of L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on plasma levels of IL-6, IL-8, TNF alpha and nitrite/nitrate in human septic shock. *Intensive Care Med* 1998;24(7):673–9.
- [33] Zhu S, Ware LB, Geiser T, Matthay MA, Matalon S. Increased levels of nitrate and surfactant protein a nitration in the pulmonary edema fluid of patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(1):166–72.
- [34] Heremans H, Dillen C, Groenen M, Matthys P, Billiau A. Role of interferon-gamma and nitric oxide in pulmonary edema and death induced by lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(1):110–7.
- [35] Pryor WA, Stanley JP. Letter: a suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonsynthetic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Organomet Chem* 1975;40(24):3615–7.
- [36] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11(1):81–128.
- [37] Lykkesfeldt J. Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. *Clin Chem* 2001;47(9):1725–7.
- [38] Petruska JM, Leslie KO, Mossman BT. Enhanced lipid peroxidation in lung lavage of rats after inhalation of asbestos. *Free Radic Biol Med* 1991;11(4):425–32.
- [39] de Andrade JA, Christie JD, Alexander CB, Young KR, McGiffin DC, Zorn GL, et al. Association of reactive nitrogen species metabolites, myeloperoxidase, and airway inflammation in lung transplants. *J Invest Med* 2001;49(2):166–72.
- [40] Cederfur CMJ, Nihlberg K, Block M, Breimer ME, Bjermer L, Westergren-Thorsson G, et al. Glycoproteomic identification of galectin-3 and -8 ligands in bronchoalveolar lavage of mild asthmatics and healthy subjects. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820(9):1429–36.
- [41] Parsons PE, Eisner MD, Thompson BT, Matthay MA, Ancukiewicz M, Bernard GR, Wheeler AP, et al. Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury. *Crit Care Med* 2005;33(1):1–6.
- [42] Batthyány CBS, Mastrogianni M, Lima A, Demicheli V, Radi R. Tyrosine-nitrated proteins: proteomic and bioanalytical aspects. *Antioxid Redox Signal* 2017;26(7):313–28.
- [43] Richard MJGP, Meo J, Favier A. High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr* 1992;577(1):9–18.
- [44] Ohkawa HON, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
- [45] Jafari MGM. Evaluation of plasma, erythrocytes, and bronchoalveolar lavage fluid antioxidant defense system in sulfur mustard-injured patients. *Clin Toxicol (Phila)* 2010;48(3):184–92.
- [46] De Andrade JA, Crow JP, Viera L, Bruce Alexander C, Randall Young K, McGiffin DC, et al. Protein nitration, metabolites of reactive nitrogen species, and inflammation in lung allografts. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(6):2035–42.