



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

RELACIÓN DE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO CON LA GRAVEDAD DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON DIAGNÓSTICO DE SEPSIS

Por

OSVALDO HÉCTOR BERGER OVALLE

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
MÉDICAS
MENCION FISIOPATOLOGÍA**

Lugar de desarrollo de la Tesis

**Laboratorio de Fisiopatología Renal
Instituto de Ciencias Biomédicas
Programa de Farmacología Molecular y Clínica
Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

**Hospital Roberto del Río
Unidad de Cuidados Intensivos
Servicio de Salud Metropolitano Norte**

**Directores de Tesis: Prof. Dr. Ramón Rodrigo S.
Prof. Dra. Bettina von Dessauer G.**

**Santiago de Chile
2013**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

OSVALDO HÉCTOR BERGER OVALLE

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Médicas con mención en Fisiopatología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de mayo de 2013

Prof. Dr. Ramón Rodrigo S.

Prof. Dra. Bettina von Dessauer G.

**Directores de Tesis
Santiago de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Francisco Cano

Prof. Dra. Ana Bañales

Prof. Dra. Emilia Sanhueza

Prof. Dr. Ruben Torres

Presidente Comisión

Dedicatoria

A mis padres Osvaldo y María Leonor, quienes han dado todo de sí para entregarme las “monedas^()” que necesito.*

A mi amada Esposa Andrea por su incondicional cariño, como mujer y madre.

A mi hijo Augusto, a quien le dejo este trabajo como testimonio de que no hay nada imposible en nuestras vidas, siempre que nos esforcemos y contemos con la ayuda de Dios.

^(*) *¿Donde están las monedas? El cuento de nuestros padres. Joan Garriga Bacardi. Ed. Rigden 2006.*

Agradecimientos

El presente trabajo no hubiera sido posible de realizar sin la ayuda desinteresada del Sr. Diego Soto H. quien con su inagotable paciencia me enseñó a desenvolverme por el laboratorio y a realizar las técnicas requeridas para esta investigación.

Al Dr. Rodrigo Castillo por sus orientaciones y buena disposición a resolver mis abundantes dudas que fueron apareciendo en el transcurso de este trabajo.

Finalmente al Dr. Ramón Rodrigo S, maestro de la Fisiopatología, de quien aprendí no solo lo que aquí queda reflejado, si no que aspectos valóricos inmensurables.

Publicaciones y presentaciones en congresos.

Berger O. Free Radicals: An Overview. Capítulo 1 del libro “Oxidative Stress And The Critically Ill Patient”. Nova Publisher, New York, USA. 2012. Ramón Rodrigo & Bettina von Dessauer Editores. https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=33315&osCsid=7886f2300d8858f0600cc32177888038

Berger O, Molina V. Biomarcadores de lipoperoxidación durante la evolución de pacientes pediátricos con sepsis. Congreso Ciencia Joven. Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile. Santiago 2011.

Libuy M, **Berger O**, Molina V, Rodrigo R. **Actividad de Catalasa como biomarcador de gravedad en sepsis pediátrica.** XXXIV Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Santiago 2012.

ÍNDICE

Abreviaturas.	7
Resumen.	8
Abstract.	9
1. Introducción.	
1.1. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.	10
1.2. Sepsis.	15
1.3. Estrés oxidativo y sepsis.	17
1.4. Diferencias entre sepsis en pediatría y en adultos.	26
2. Hipótesis de trabajo.	29
3. Objetivos.	
3.1 Objetivo general.	29
3.2 Objetivos específicos.	29
4. Metodología.	
4.1 Diseño del estudio.	30
4.2 Pacientes.	30
4.3 Criterios de inclusión y exclusión.	31
4.4 Medición de la gravedad clínica de los pacientes.	31
4.5 Análisis estadístico.	33
4.6 Obtención de muestras de sangre de los pacientes.	35
4.7 Determinación de los biomarcadores.	35
5. Resultados.	
5.1 Características clínicas de los pacientes.	37
5.2 Caracterización del nivel de lipoperoxidación por día de hospitalización.	38
5.3 Caracterización del potencial antioxidante por día de hospitalización.	39
5.4 Comportamiento de los biomarcadores según grupos etarios.	42
5.5 Asociación de la gravedad clínica de la sepsis con el nivel de lipoperoxidación.	43
5.6 Asociación de la gravedad clínica de la sepsis con el nivel del potencial antioxidante de los pacientes.	44
6. Discusión.	46
7. Conclusiones.	56
8. Bibliografía.	57
9. Anexos	63

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARE:	Antioxidant response element
CAT:	Catalasa
COX-2:	Ciclooxigenasa 2
eNOS:	Óxido nítrico sintasa endotelial
FRAP:	Ferric reducing ability of plasma
GSH:	Glutación reducido
GSSG:	Glutación oxidado (disulfuro)
GSH-Px:	Glutación peroxidasa
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
HOCL:	Ácido hipocloroso
iNOS:	Óxido nítrico sintasa inducible
MDA:	Malondialdehído
NADPH:	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidasa
NF-κB:	Factor nuclear kappaB
NO:	Óxido nítrico
NOS:	Óxido nítrico sintaza
O₂^{·-}:	Radical superóxido
OH[·]:	Radical hidroxilo
ONOO⁻:	Peroxinitrito
PCR:	Proteína C reactiva
PELOD:	Pediatric Logistic Organ Disfunction
PKC:	Proteína quinasa C
SOD:	Superóxido dismutasa
SOFA	Sepsis related organ failure assessment
SIRS:	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
TBARS:	Thiobarbituric acid reactants
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral-α
UCI:	Unidad de Cuidados Intensivos

Resumen

En pacientes pediátricos, la sepsis es una causa importante de morbimortalidad, con una letalidad aproximada al 10%.

Dentro de la fisiopatología de la sepsis, el estrés oxidativo juega un papel importante como agente promotor y de mal pronóstico en adultos. En niños no hay estudios que demuestren esta asociación, presentando ambos grupos diferencias fisiopatológicas de la sepsis.

Objetivos: Determinar la relación existente entre el estrés oxidativo y la gravedad clínica de la sepsis en pacientes pediátricos.

Hipótesis. La gravedad clínica de pacientes con sepsis muestra una correlación positiva con los biomarcadores de lipoperoxidación y negativa con el potencial antioxidante en sangre.

Metodología. Se obtuvieron niveles de lipoperoxidación y antioxidantes de niños hospitalizados en la Unidad de Paciente Crítico del Hospital Roberto del Río, cuyo diagnóstico de ingreso fue sepsis y/o shock séptico, excluyéndose del grupo de estudio a pacientes con otras patologías. Los biomarcadores se obtuvieron diariamente por 3 días o hasta el alta de la unidad. Se determinó la asociación entre el nivel de los biomarcadores y la gravedad del cuadro clínico evaluado mediante el score de PELOD.

Resultados. En 18 pacientes, el nivel de lipoperoxidación no demostró variación significativa durante la estadía en UCI ni correlación con el score de gravedad. En cambio, el potencial antioxidante mostró un aumento de actividad enzimática de catalasa y glutatión peroxidasa, con una disminución del FRAP y de la relación GSH/GSSG en el transcurso de la hospitalización. Se observó correlación negativa entre la actividad de catalasa con el score PELOD y los días de hospitalización. También fue observada una correlación positiva entre la relación GSH/GSSG y el PELOD al tercer día.

Conclusiones. La catalasa es un buen indicador de la gravedad clínica de los pacientes pediátricos con sepsis. El presente estudio podría constituir la base para futuros estudios que evalúen la utilidad de la terapia antioxidante para estos pacientes.

Abstract

In pediatric patients, sepsis is a major cause of morbidity and mortality, with a fatality rate of approximately 10%.

Within the pathophysiology of sepsis, oxidative stress plays an important role as an promoter agent and poor prognosis factor in adults. In children there are no studies that demonstrate this association, with important differences in pathophysiology of sepsis in both groups.

Objectives. To determine the relationship between oxidative stress and the clinical severity of sepsis in pediatric patients.

Hypothesis. The clinical severity of patients with sepsis has a positive correlation with levels of biomarkers of lipid peroxidation and a negative correlation with blood antioxidant potential.

Methodology. Levels of lipoperoxidation and antioxidants in children hospitalized in the Intensive Care Unit of the Hospital Roberto del Rio was obtained, whose primary diagnosis is sepsis and/or septic shock, excluding of study group patients with other pathologies. Biomarkers was obtained daily for 3 days or until discharge from the unit. Association between level's of biomarkers and clinical severity assessed by PELOD score was searched.

Results. In 18 patients, the level of lipid peroxidation showed no significant change during the stay in ICU and no significant correlation with severity score. In contrast, the antioxidant potential showed increased enzymatic activity of catalase and glutathione peroxidase, decreased FRAP and the ratio GSH/GSSG during hospitalization. Negative correlation was observed between catalase activity and PELOD score and days of stay. It was also observed a positive correlation between GSH/GSSG and PELOD score in the third day.

Conclusions. Catalase is a good indicator of clinical severity of pediatric patients with sepsis. This study could be a base for future studies based on therapeutic antioxidant therapy for these patients.

1. Introducción

1.1. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Las especies reactivas de oxígeno (O_2^- anión superóxido, OH radical hidróxilo, H_2O_2 peróxido de hidrógeno y singlete de oxígeno) y de nitrógeno (NO óxido nítrico, y ONOO- peroxinitrito) son producidas de manera habitual por el metabolismo celular y consisten en su mayoría en radicales libres, es decir, moléculas que poseen uno o más electrones desapareados en sus orbitales ^(1,2). Las especies reactivas tienen un doble rol en los organismos: cumplen funciones fisiológicas y pueden ser nocivas ⁽³⁾. Tabla 1.

Los efectos fisiológicos de las especies reactivas ocurren con una baja concentración de ellas, e involucran acciones en la respuesta celular al daño, por ejemplo: defensa contra agentes infecciosos, señalización celular y regulación del tono vascular⁽³⁾.

Una de las funciones principales en la que intervienen, es la respuesta inmune. En ella, los fagocitos incrementan su consumo de oxígeno y mediante la enzima NADPH oxidasa producen anión superóxido desde el cual posteriormente se forma peróxido de hidrógeno. Desde el peróxido de hidrógeno, la enzima mieloperoxidasa de los neutrófilos produce ácido hipocloroso el que cumple una función muy importante en la vacuola fagocitaria ⁽⁴⁾.

Especie reactiva	Fuente de origen	Función fisiológica	Efecto fisiopatológico
O ₂	Atmósfera, producto de la fotosíntesis	Es utilizado en la mitocondria para la generación de ATP en la fosforilación oxidativa.	Formación de especies reactivas
¹ O ₂	Mieloperoxidasa de leucocitos, reacción de rayos UV con algunos pigmentos	Estallido respiratorio de neutrófilos. Modificación de factores hemostáticos (fibrinógeno, factor V, factor VIII; factor X) y regulación de la hemostasia. Inhibición de la agregación plaquetaria	Oxidación de colesterol LDL, fotohemólisis.
O ₂ ^{•-}	Reducción de oxígeno por NADPH oxidasa y XO. Cadena transportadora de electrones en la mitocondria. Citocromo P450, eNOS desacoplada.	Cascada de señalización intracelular. Estallido respiratorio de neutrófilos	Oxidación de componentes intracelulares como ADN, lípidos y proteínas. Formación de H ₂ O ₂ y de ONOO ⁻
H ₂ O ₂	A partir de O ₂ ^{•-} por la enzima SOD. <i>In vivo</i> por Glicolato oxidasa, XO, y D-aminoacidoxidasa.	Sobrerregulación de moléculas de adhesión, Regulación de la proliferación celular o apoptosis, modulación de la agregación plaquetaria. Producción de hormonas tiroideas. Induce expresión de genes controlados por NF-κB. Cascada de señalización intracelular.	Niveles elevados pueden dañar mecanismos de producción energética intracelular como inactivación de la enzima glicolítica acetaldéhid-3-fosfato dehidrogenasa. Activación del factor de transcripción NF-κB
•OH	A partir de H ₂ O ₂ por exposición a luz UV o por interacción con metales de transición. (Reacciones de Fenton y Heber-Weiss).	Señalización intracelular de apoptosis.	Oxidación de lípidos, proteínas y ácido nucleico. Daño en ADN mediante quiebre de enlaces, modificación de bases. Daño en bases purínicas y pirimídicas, y en el esqueleto de desoxirribosa. Peroxidación lipídica extrayendo un átomo de H de un enlace C-H.
NO	Oxidación de un átomo terminal de guanido-nitrógeno de L-arginina hacia citrulina por enzimas NOS.	Molécula de señalización. Regulación del tono vascular. Secreción de insulina. Regulación del tono de vías respiratorias y peristalsis. Participación en la angiogénesis, desarrollo del SNC y neurotransmisión. Estimulación de guanilato ciclasa para la generación del segundo mensajero GMP cíclico. Regulación de la contracción e inotropismo cardíaco. Respuesta inmune fagocitaria.	Mutaciones en gen p53. Deaminación del ADN. Inhibición del sistema enzimático de reparación del ADN. Daño mitocondrial
ONOO ⁻	Reacción del NO con O ₂ ^{•-} Reacción de H ₂ O ₂ con NO ₂ ⁻	Regulación de algunas funciones proteicas	Daño en el DNA por fragmentación. Lipoperoxidación. Formación de •OH. desnitrogenación de proteínas. Daño mitocondrial directo e indirecto por desbalance NADH/NAD ⁺ . Inactivación de GSH-Px

Tabla 1. Resumen de algunas funciones fisiológicas y efectos fisiopatológicos de las principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

El efecto nocivo de las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno se traduce en un daño de estructuras celulares, lípidos, proteínas y DNA.

Los organismos cuentan con un sistema de protección antioxidante integrado por dos componentes: (i) moléculas que se encargan de donar o aceptar un electrón a la especie reactiva para que no quede esta con electrones desapareados. Ejemplos son el ácido ascórbico (Vitamina C), α-tocoferol (Vitamina E), glutatión reducido (GSH), carotenos y flavonoides,

entre otros. Estas moléculas antioxidantes al interactuar con especies reactivas se transforman en un radical libre más estable y menos reactivo que la especie reactiva con la cual interactuaron. (ii) El otro componente está formado por enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y catalasa (CAT). Estas enzimas catalizan las reacciones de conversión de las especies reactivas en especies más estables y menos dañinas⁽⁵⁾.

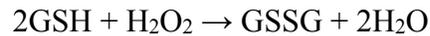
La enzima SOD cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno.



Debido a esta reacción, SOD es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células, encontrándose tres isoformas en humanos, SOD1 en el citoplasma, SOD2 en la mitocondria y SOD3 en el líquido extracelular. Esta enzima utiliza como cofactor cobre, zinc, manganeso, hierro o níquel.

El glutatión está presente en prácticamente todos los tejidos. Provee capacidad reductora para un gran número de reacciones y tiene un importante rol en la destoxicación del peróxido de hidrogeno y de otros radicales libres⁽⁶⁾. Existe en los estados reducido (GSH) y oxidado (GSSG). En el estado reducido, es capaz de donar un equivalente de reducción ($\text{H}^+ + \text{e}^-$) a otras moléculas inestables, como las especies reactivas de oxígeno. En la donación de un electrón, el glutatión se convierte en reactivo, pero reacciona rápidamente con otro glutatión reactivo para formar disulfuro de glutatión o glutatión oxidado. Esta reacción es posible debido a la alta concentración de glutatión en las células (5 mM en el hígado). El GSH puede regenerarse a partir de GSSG por la enzima glutatión reductasa.

La enzima glutatión peroxidasa, cataliza la reacción de oxidación del glutatión reducido a glutatión oxidado, utilizando para ello peróxido de hidrógeno. Esta enzima usa como cofactor selenio.



En las células y tejidos sanos, más del 90% de glutatión total está en la forma reducida (aproximadamente 3100 $\mu\text{mol/L}$) y menos del 10% existe en la forma oxidada (0-244 $\mu\text{mol/L}$).

Un aumento de la proporción entre GSSG y GSH se considera un indicativo de estrés oxidativo y se ha asociado a varias patologías incluyendo sepsis ^(7,8).

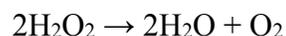
El rol protector de GSH ante el daño oxidativo consiste en ⁽⁹⁾:

- Es un cofactor de varias enzimas detoxificantes de daño oxidativo, como GSH-Px y GSH transferasa
- Participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática.
- Quelando directamente OH y oxidosinglete, detoxificando H_2O_2 y peróxidos lipídicos por la acción catalítica de GSH-Px
- Es capaz de regenerar el ácido ascórbico y α -tocoferol a sus formas activas.

La enzima catalasa se encuentra de manera soluble y en grandes concentraciones en glóbulos rojos. Cumple una función protectora de la hemoglobina y de otras proteínas del eritrocito.

El valor normal en la sangre es de 313 ± 96 k/g. Hb ⁽¹⁰⁾.

La enzima cataliza la siguiente reacción:



Estrés oxidativo ocurre cuando el sistema antioxidante se ve sobrepasado por mayor actividad formadora de especies reactivas. Este estado, debido al daño que genera a nivel celular, ha sido implicado como causante y contribuyente de numerosas patologías, tales como cáncer, envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares entre otras ⁽⁶⁾.

En niños se ha observado un aumento de los biomarcadores de estrés oxidativo y disminución de antioxidantes en patologías como la malaria, esquistosomiasis y hepatitis A ⁽¹¹⁾.

La medición directa de especies reactivas resulta compleja en seres vivos, debido a su corta vida media y a que requiere de técnicas complejas como la resonancia electrónica de espín. Por este motivo, es preferible medir el nivel de estrés oxidativo indirectamente, mediante la determinación de niveles de antioxidantes o mediante la medición del daño oxidativo producido. Esto último se puede cuantificar mediante la determinación de productos resultantes del daño oxidativo, tales como malondialdehído, el cual es generado por la degradación oxidativa de lípidos polinsaturados, y F2-isoprostanos que son productos derivados de la oxidación del ácido araquidónico. Esta oxidación es independiente de la actividad enzimática de ciclooxigenasa, pero catalizada por radicales libres del oxígeno en las membranas celulares y partículas de LDL, proceso llamado lipoperoxidación ⁽¹²⁾. Los F2-isoprostanos pueden ser determinados en muestras de plasma y orina, y reflejan un nivel oxidativo generalizado. Sus valores normales se han descrito entre 5 a 40 pg/mL en plasma y 500 a 4000 pg/Mg de creatinina en orina. Estas sustancias también han demostrado ser biológicamente activas, produciendo daño oxidativo al ser generadas, ya que se ha observado que son potentes vasopresores renales y pulmonares ⁽¹³⁾.

La medición de F2-isoprostanos ha demostrado utilidad en enfermedades como el Alzheimer y enfermedades cardiovasculares ⁽¹⁴⁾.

En la lipoperoxidación, se produce daño estructural a nivel de todas las membranas lipídicas intracelulares ⁽¹⁴⁾, siendo un blanco común las membranas de los lisosomas y peroxisomas, produciendo el escape de enzimas hidrolíticas que producen daño intracelular.

1.2. Sepsis

Sepsis es un síndrome inflamatorio complejo, con un amplio espectro de presentaciones clínicas en cuanto a gravedad del paciente. Corresponde a un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en presencia de infección⁽¹⁵⁾.

SIRS en pediatría se define como: la presencia de al menos dos de los siguientes criterios, siendo uno de ellos temperatura alterada o recuento anormal de leucocitos ⁽¹⁶⁾:

- Temperatura central mayor a 38,5° C o menor a 36° C.
- Taquicardia. Frecuencia cardíaca mayor a 2 desviaciones estándar para la edad, en ausencia de estímulos externos, que dure entre 0,5 y 4 horas. En menores de 1 año bradicardia. Frecuencia cardíaca menor a percentil 10 para edad sin estímulos externos por más de 30 minutos.
- Polipnea. Frecuencia respiratoria mayor 2 desviaciones estándar para la edad.
- Leucocitos elevados o disminuidos para la edad, no relacionado a causa externa, o mayor a 10% de neutrófilos inmaduros.

Sepsis severa ocurre con la presencia de falla multiorgánica, la que es definida como el daño y la falla simultánea en 2 o más sistemas. Esta es una importante causa de morbimortalidad en

las unidades de cuidados intensivos pediátricos, con una mortalidad aproximada al 10% en Estados Unidos y con un gran gasto de recursos comprometidos ⁽¹⁷⁾.

Shock séptico se define en adultos como un estado de sepsis asociado a hipotensión sostenida pese al adecuado aporte de volumen. En niños el shock séptico es caracterizado por taquicardia con signos de hipoperfusión, tales como disminución de pulsos distales, compromiso de conciencia, disminución del llene capilar y oligoanuria, aún en ausencia de hipotensión ⁽¹⁸⁾.

La respuesta inflamatoria ante una infección es iniciada por la unión de productos de microorganismos a células inmunitarias ⁽¹⁹⁾. Posteriormente se produce la activación del sistema inmune con la liberación de citoquinas, activación del complemento y generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Estas especies reactivas se producen de manera temprana en la respuesta inflamatoria ya que son parte de la defensa del organismo ante la invasión por microorganismos.

La respuesta inflamatoria inicial es rápidamente seguida por una respuesta antiinflamatoria compensadora, la cual si es excesiva o predominante sobre la inflamatoria, predisponen al paciente a mayor riesgo de adquirir infecciones oportunistas o secundarias ^(20, 21).

Diferentes factores promueven un desbalance entre la inflamación local y la respuesta antiinflamatoria, dando lugar a la instalación de SIRS en el caso de un desbalance hacia la inflamación ⁽²²⁾.

Se ha demostrado que en la sepsis, el sistema inmunitario presenta dos fases: se comienza tempranamente con un estado pro inflamatorio, sin embargo de manera más tardía hay un predominio anti inflamatorio y de disminución de la respuesta inmunitaria ⁽²³⁾.

1.3. Estrés oxidativo y sepsis

No está del todo claro el cómo y el por qué, en pacientes con sepsis se produce un desbalance en las reacciones de tipo redox favoreciendo tempranamente un ambiente de estrés oxidativo, el cual perpetuándose en el tiempo produce cambios en la respuesta inflamatoria, tales como disminución de la quimiotaxis, aumento de la fagocitosis, activación de NF- κ B, apoptosis de células endoteliales y depresión miocárdica ^(3,22,24-27). Una de las hipótesis actuales de este incremento del nivel oxidativo ocurrido en sepsis, es debido a una excesiva respuesta inflamatoria, caracterizada por una producción masiva de especies reactivas y citoquinas inflamatorias. Figura 1.

Como fuentes de especies reactivas en pacientes con sepsis se han identificado ⁽²⁴⁾:

- Activación de células fagocitarias en el llamado “estallido respiratorio”.
- Producción de NO por el endotelio.
- Liberación de iones de hierro y cobre.
- Isquemia, reperfusión y activación de la enzima Xantino Oxidasa.
- Fuga de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial
- Metabolismo del ácido araquidónico ⁽²⁸⁾.
- Sobre regulación del ensamble de NADPH oxidasa en neutrófilos ⁽²⁹⁾.

Las especies reactivas generadas ante una respuesta inflamatoria inicial son necesarias para la defensa del organismo, y su déficit como en el caso de O_2^- ha demostrado ser perjudicial ⁽²³⁾.

Las especies reactivas actúan produciendo directamente el daño celular y activando la cascada de señalización intracelular de inflamación, principalmente mediante la activación del factor

de transcripción NF- κ B produciendo síntesis de moléculas inflamatorias de fase aguda como TNF- α , IL2 y receptor de IL2 ⁽³⁰⁾. Por otro lado, sustancias como el NO y H₂O₂ actúan como moléculas de señalización intra y extracelular, activando diversos genes mediante factores de transcripción como NF- κ B y Nrf2.

Al librarse de Keap1 y Cul3, Nrf2 activa la transcripción de elementos de respuesta antioxidante (ARE) para contrarrestar el efecto dañino del estrés oxidativo, como las enzimas glutatión S transferasa y glutamato cisteína ligasa, responsables de la síntesis de GSH ⁽³¹⁾. Se ha reportado en ratones con sepsis inducida por lipopolisacáridos, una mayor probabilidad de muerte temprana en especies deficientes de Nrf2 ⁽³²⁾. Del mismo modo, en ratones transgénicos que degradan menos Nrf2, se ha comprobado una menor mortalidad en sepsis polimicrobiana ⁽³³⁾.

La liberación de NF- κ B de su inhibidor I κ B, ya sea por acción de H₂O₂ o de TNF- α inicia su activación y transcripción de enzimas pro oxidativas como iNOS y COX-2 con la generación de NO y O₂⁻ ^(34,35).

Dos grupos de investigadores han mostrado que la actividad de NF- κ B es significativamente mayor en no sobrevivientes de sepsis comparado con un grupo control de sobrevivientes y que la actividad de NF- κ B predice la mortalidad en sepsis ^(36,37).

La activación de monocitos y células endoteliales por lipopolisacáridos lleva a la expresión de iNOS y la consecuente transformación de L-arginina a NO en concentraciones micromolares (eNOS produce NO en concentraciones nanomolares). Animales deficientes de iNOS

expuestos a endotoxina muestran menor gasto cardíaco pero mejor sobrevida al compararlo con controles ^(38,39).

En niños con sepsis, se ha observado un incremento significativo en la producción de NO ⁽⁴⁰⁻⁴²⁾. Una excesiva producción de NO se ha correlacionado con la gravedad de la sepsis en adultos ⁽⁴³⁾. NO puede combinarse con O_2^- para formar $ONOO^-$ causando daño tisular directo ⁽³⁶⁾ e inhibición de GSH-Px ⁽⁴⁵⁾. Además el NO induce la formación de Metahemoglobina la que produce hemólisis, estimulación de IL6 e IL8 y activación de NF- κ B, produciendo más iNOS ⁽⁴⁶⁾. En recién nacidos con sepsis se ha reportado mayores niveles de metahemoglobina en comparación con niños sanos ⁽⁴⁷⁾.

Se ha visto un aumento importante de O_2^- en pacientes con sepsis, apoyado por el aumento de la actividad de SOD. Este aumento se produce principalmente por la entrada de especies reactivas a la célula lo que activa la expresión de NADPH oxidasa, COX-2 y XO. Además la generación de O_2^- es producida por el escape de electrones desde la cadena transportadora de electrones mitocondrial, la cual puede ser inhibida por acción de NO en pacientes con sepsis, produciendo una mayor cantidad de O_2^- ⁽⁴⁸⁾, lo que puede ser evitado administrando inhibidores de iNOS ⁽⁴⁹⁾. En la mitocondria, el O_2^- es dismutado por la SOD en H_2O_2 el cual difunde al citosol y puede activar NF- κ B produciendo más iNOS ⁽²³⁾.

En sepsis, la producción excesiva de especies reactivas daña directamente a las células del epitelio endotelial, contribuyendo al daño tisular inflamatorio ⁽⁵⁰⁾.

Como consecuencia, ocurre daño endotelial que puede progresar al resto del organismo.

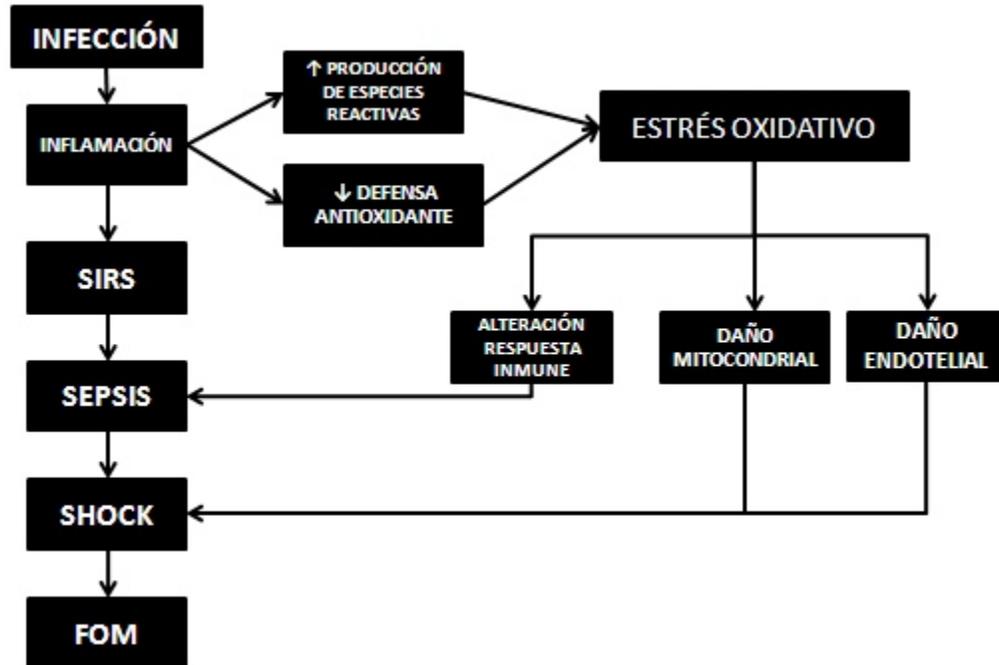


Figura 1. Relación entre estrés oxidativo y fisiopatología de sepsis. El patógeno que produce infección, desencadena una respuesta inflamatoria inicial la cual genera el estallido respiratorio por parte de neutrófilos, produciéndose una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno lo que produce un estado de estrés oxidativo inicial. La respuesta inflamatoria se propaga por el organismo generando un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y sepsis. El estrés oxidativo produce además una alteración de la respuesta inmunitaria, daño endotelial y mitocondrial lo que va a producir un cuadro de shock séptico y falla orgánica múltiple (FOM).

Se cree que el daño endotelial producido es uno de los componentes más importantes del shock séptico ⁽⁵¹⁾. En este contexto, el comportamiento de estas células endoteliales implica cambios en diferentes funciones inmunes como aumento en la adherencia y fagocitosis, y disminución de la quimiotaxis ^(9, 24).

A pesar de un adecuado aporte de fluidos y disponibilidad de O₂ en sangre, en el shock séptico hay una menor densidad de capilares perfundidos, produciéndose una disfunción a nivel de la microvasculatura ⁽⁵²⁾. Esta disfunción microvascular, sumada a la alteración de la captación y utilización del oxígeno por la célula, se traduce en hipoxia tisular y falla orgánica múltiple (FOM), con mayor riesgo de mortalidad entre los pacientes ⁽⁵³⁾.

Aparte de la disfunción microvascular, otro mecanismo fisiopatológico descrito en el shock séptico es la “hipoxia citopática”, la cual involucra que aunque haya una buena entrega de oxígeno a la célula, ésta no lo puede utilizar a causa de una disfunción a nivel mitocondrial ⁽⁵⁴⁾. Se han evidenciado daños ultraestructurales en mitocondrias de miocardiocitos de pacientes con sepsis ⁽⁵⁵⁾.

La disfunción mitocondrial se produce por un daño oxidativo de la membrana mitocondrial produciéndose despolarización y desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa, asociado a una disminución de antioxidantes intramitocondriales ⁽⁴³⁾. El daño mitocondrial se produce por la producción excesiva de NO ya sea por la iNOS o la oxidonítrico sintasa mitocondrial (mtNOS), lo que involucra: (i) un efecto irreversible de NO y ONOO⁻ en la NADH-ubiquinona reductasa y ubiquinol-citocromo c reductasa (complejo III), y (ii) una inhibición competitiva reversible de la actividad de la citocromo c oxidasa ⁽⁹⁾.

Además el ONOO⁻ produce indirectamente un mayor índice de NADH/NAD⁺ lo que eleva la producción de O₂⁻ en el complejo I ⁽⁵⁷⁾.

Esto produce disminución en la producción de ATP, liberación de citocromo C, activación de caspasas y apoptosis ^(58,59). Todo lo anterior involucra que la célula no utilice el oxígeno para la formación de ATP y se genere el escape de electrones desde la cadena transportadora con la consecuente formación de anión superóxido ⁽⁶⁰⁻⁶³⁾. La disminución en la respiración celular mitocondrial es compatible con la disminución de la temperatura corporal y la disminución (en aproximadamente un 30%) del consumo de O₂ observado en el shock séptico ⁽⁶⁴⁾.

La severidad de la disfunción mitocondrial durante la sepsis se correlaciona con desenlaces adversos, incluyendo inestabilidad hemodinámica, reducción de los niveles tisulares de ATP y mortalidad aumentada ⁽⁶⁵⁾.

Un sistema inmune activado y una disfunción mitocondrial representan las dos fuentes más importantes para la generación de especies reactivas ⁽⁶⁶⁾.

Los pacientes con sepsis fallecen entre días a semanas después del comienzo de la infección inicial y en algunos casos incluso después de que la infección original ha sido erradicada.

Entre un 10 a 40% de los pacientes con sepsis diagnosticada, presentan cultivos negativos.

Todo lo anterior sugiere que la inflamación y estallido respiratorio inicial no son responsables directos de la disfunción orgánica de la sepsis ⁽⁶⁷⁾. Estos hechos implican que la infección puede, bajo ciertas condiciones específicas, activar un ciclo de tipo redox autosustentable y auto promovible. Figura 2.

En vez de apagarse una vez que se ha erradicado el patógeno, o con la fase antiinflamatoria tardía, el ciclo redox de la sepsis continúa drenando energía por el daño mitocondrial y evitando un funcionamiento normal por varios feedback positivos ligados a la activación de NF- κ B ⁽²³⁾.

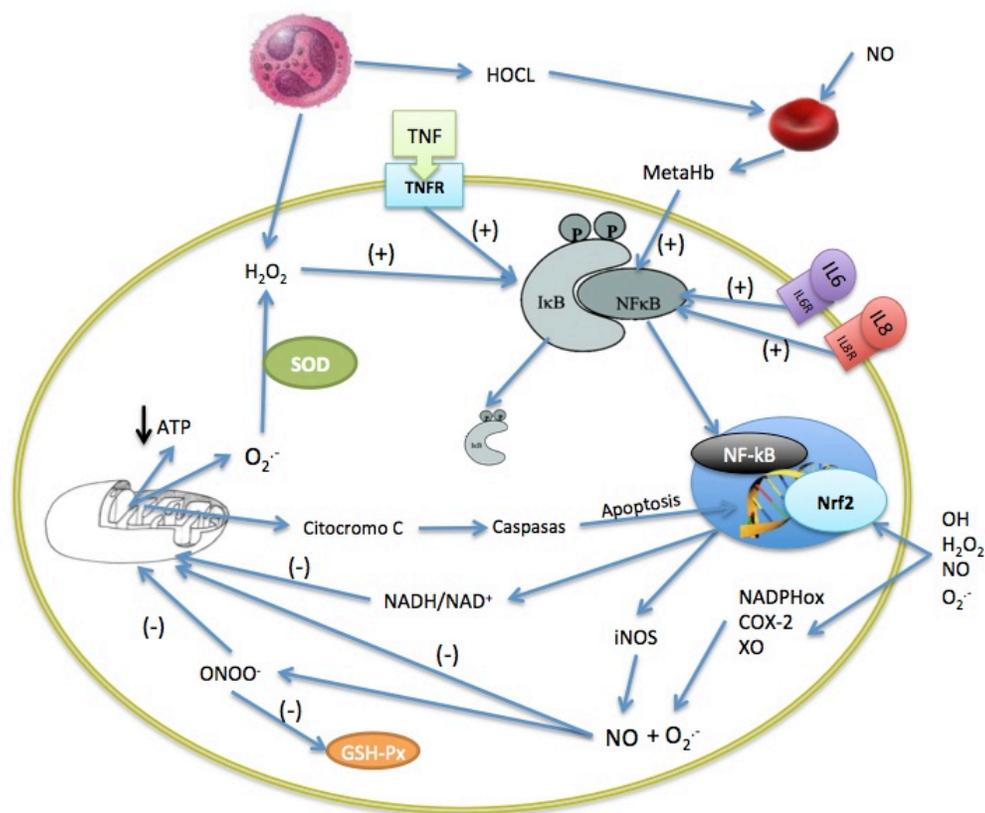


Figura 2. Ciclo redox de la sepsis. La activación de neutrófilos en la respuesta inflamatoria inicial, produce la formación de varias sustancias, como HOCL el cual produce hemólisis. Debido a la hemólisis y NO se produce metahemoglobina, la que dentro de otros efectos y junto al H₂O₂, TNF-α, IL6 e IL8 producen la activación de NF-κB. Este factor de transcripción produce mayor síntesis de iNOS lo que aumenta en cientos de veces la producción de NO intracelular el cual de manera directa o al ser combinado con O₂⁻ para formar ONOO⁻ producen daño mitocondrial, el que se traduce en un déficit en la producción de ATP y desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones. Esto genera O₂⁻ el cual por acción de la SOD es dismutado a H₂O₂ potenciando el ciclo redox. El ONOO⁻ inactiva a la GSH-Px intracelular. El daño mitocondrial produce la liberación del citocromo c desde la mitocondria, el cual activa caspasas que van a producir señales de apoptosis. El ONOO⁻ va a producir una alteración en la relación NADH/NAD⁺ lo que va a producir indirectamente daño mitocondrial.

En pacientes adultos con sepsis, se ha encontrado una elevada concentración de biomarcadores de estrés oxidativo y una baja concentración de antioxidantes (68-75).

En ratones se han detectado niveles hepáticos elevados de lipoperoxidos y bajos de SOD y GSH-Px entre 6 y 18 horas después de la administración de endotoxina (71).

En pacientes con sepsis se han encontrado menores niveles de antioxidantes y mayores niveles de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), especialmente en pacientes con falla orgánica múltiple ^(75, 76), mayores niveles de MDA y 4-hidroxinonal, indicando un aumento de la lipoperoxidación ^(69, 77).

Actividad aumentada de la enzima XO ha sido observada en adultos con sepsis ⁽⁷⁷⁾.

El ciclo de GSH se ve aumentado tempranamente en ratas con sepsis, y es acompañado por: (i) un incremento en la síntesis de GSH en varios tejidos, especialmente en hígado, (ii) y por bajas concentraciones plasmáticas de GSH ⁽⁷⁸⁾.

Por otra parte, se han reportado bajos niveles (menor de 40%) de selenio (cofactor de GSH-Px) en pacientes con sepsis ⁽⁷⁹⁾.

Un aumento en la concentración plasmática de NO ha sido descrito en pacientes con shock séptico ⁽⁷²⁾.

Los niveles de F2-isoprostanos en adultos con sepsis, son mayores en pacientes con falla renal y hepática, correlacionándose directamente con un aumento de la mortalidad ⁽⁸⁰⁾.

Se ha reportado que en pacientes sépticos, la capacidad antioxidante del plasma es menor que la de sujetos sanos al inicio de la infección ⁽⁸¹⁾. Niveles bajos de ácido ascórbico se han detectado en pacientes con sepsis que evolucionan a falla multiorgánica versus aquellos que no ⁽⁸²⁾. También se ha evidenciado bajos niveles de α -tocoferol ^(75, 83), Vitamina A, β -caroteno y licopeno ⁽⁷⁵⁾.

Como factores pronósticos, se han reportado niveles elevados de MDA en pacientes no sobrevivientes versus sobrevivientes de sepsis ⁽⁸³⁾. Incrementos normales o sobre el promedio en la capacidad antioxidante del plasma, han sido observados en sobrevivientes de cuadros

sépticos ⁽⁸⁴⁾. Se ha descrito una correlación entre la severidad de la sepsis y niveles musculares de GSH ⁽⁸⁵⁾.

También se ha demostrado evidencia del uso de antioxidantes para mejorar el desenlace en pacientes críticos; la administración de ácido ascórbico y α -tocoferol se asoció a mejorías en la supervivencia ⁽⁸⁶⁾, disminución en la falla orgánica y acortamiento de los días de estadía en UCI de adultos ⁽⁸⁷⁾. La administración de selenio en altas dosis mejoró significativamente el score SOFA en un grupo de pacientes adultos ⁽⁸⁸⁾.

En niños con sepsis se ha observado un incremento de la actividad de la XO ⁽⁸⁶⁾, bajos niveles sanguíneos y de síntesis de GSH ⁽⁸⁾ y una relación GSSG/GSH elevada ⁽⁸⁹⁾. También se han descrito niveles aumentados en la síntesis de NO ⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾. En recién nacidos con sepsis se han observado valores elevados de MDA, SOD, GSH-Px y CAT, junto con valores disminuidos de ácido úrico y albúmina plasmática (ambos antioxidantes plasmáticos). En el mismo estudio, se determinó una correlación positiva entre los niveles de MDA y de antioxidantes (SOD, CAT, GSH-Px) ⁽⁹²⁾.

La disminución de los antioxidantes en sepsis puede producirse por ⁽³⁰⁾:

- 1-Pérdidas de fluidos corporales que contengan antioxidantes.
- 2-Disminución de ingesta de antioxidantes y nutrientes para su síntesis.
- 3-Dilución del plasma por aporte de fluidos intravenosos.
- 4-Redistribución de los antioxidantes hacia tejidos inflamados.
- 5-Mayor consumo en los procesos metabólicos

Según la evidencia anterior, los antecedentes apuntan hacia una posible relación entre el nivel de estrés oxidativo y el pronóstico y supervivencia de los pacientes con sepsis, lo cual aún no ha sido debidamente analizado en niños.

1.4. Diferencias entre sepsis pediátrica y de adultos

En pacientes pediátricos hay escasez de estudios que relacionen el nivel de estrés oxidativo con la gravedad del cuadro séptico y no resulta válido el extrapolar los datos obtenidos de adultos ya que hay varias diferencias en la fisiopatología, presentación clínica y enfrentamiento terapéutico.

La mortalidad observada en unidades de cuidados intensivos, es menor en unidades pediátricas que en las de adultos (10% versus 20%) ⁽⁹³⁻⁹⁵⁾.

Si bien la mortalidad es menor, la sobrevida puede asociarse a secuelas graves como: neurológicas (parálisis cerebral, hemorragia intra ventricular, leucomalacia periventricular), respiratorias (síndrome de distrés respiratorio, displasia broncopulmonar), cardíacas (persistencia del ductus arterioso), visuales y auditivas ⁽⁹⁵⁾.

El síndrome de falla orgánica múltiple es más frecuente que la defunción por sepsis en las unidades de cuidado intensivo pediátrico (11% a 27%) ^(96, 97).

La transición de la circulación fetal a la neonatal conlleva una tendencia a la hipertensión pulmonar en pacientes sépticos pediátricos. Esto se traduce en una buena respuesta a vasodilatadores pulmonares a diferencia de lo que ocurre en adultos, en donde hay un incremento en la producción de óxido nítrico, hipotensión y falla multiorgánica ^(98,99).

La presentación del shock séptico es diferente en adultos comparados con niños. Casi el 90% de los pacientes adultos presentan un shock hiperdinámico o “shock caliente” caracterizado por hipotensión, resistencia vascular periférica disminuida y taquicardia. La disminución de la resistencia vascular periférica y la taquicardia son un mecanismo compensatorio de la disminución del inotropismo, logrando que el gasto cardiaco de estos pacientes se mantenga o se encuentre levemente aumentado.

Dado lo anterior, cuando no hay buena respuesta al aporte de volumen y drogas vasoactivas, se ha observado mal pronóstico en los pacientes con shock séptico ⁽¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾.

En niños, dada la mayor labilidad hídrica y la redistribución del espacio intra y extravascular, es marcada la hipovolemia relativa durante el shock séptico, por lo que se observa una mejor respuesta al uso y corrección de volumen precoz. Casi el 50% de los niños presenta disminución del pulso distal observado como un llene capilar enlentecido y elevada resistencia vascular periférica inicial, por lo que el cuadro clínico es referido como “shock frío” ⁽¹⁰³⁾. Otro aspecto, en actual discusión, es la falla miocárdica producida en pacientes pediátricos en este contexto fisiopatológico ⁽¹⁰⁴⁾. Los niños tienen una menor reserva cardíaca cronotrópica comparada con adultos, ya que poseen frecuencias cardíacas basales más elevadas, por lo que si duplican su frecuencia cardíaca, el llene diastólico disminuye drásticamente. De esta manera, la principal respuesta a la disminución del gasto cardíaco es la vasoconstricción, la cual agrava aún más la falla de bomba ⁽¹⁰⁵⁾.

En niños sépticos no se ha observado un estado protrombótico por actividad de la proteína C, como en adultos, por lo que no es recomendable la administración de ésta proteína en

pacientes pediátricos ⁽¹⁰⁶⁾. Por otra parte, sí se ha visto una mayor incidencia de trombocitopenia asociada a sepsis en pacientes pediátricos que en adultos ⁽¹⁰⁷⁾.

Pese a que los niños son más susceptibles de ser infectados, presentan menor incidencia de sepsis que los adultos ⁽¹⁰⁸⁾. Esto implicaría que los patógenos no son el único determinante en el desarrollo de la sepsis en niños ⁽⁹⁵⁾.

El sistema de inmunidad innata en niños, en condiciones de sepsis, muestra las siguientes diferencias con el de adultos: (i) menor capacidad para generar especies reactivas; (ii) diferencias en el tipo de citoquinas utilizadas; (iii) disminución del *pool* de neutrófilos y capacidad reducida de proliferación de progenitores; (iv) disminución de granulocitos y neutrófilos; (v) neutrófilos con función disminuida con menor capacidad de migración, quimiotaxis, adherencia endotelial y fagocitosis ⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾. Consecuente con esto, el estallido respiratorio en niños es menos intenso que en adultos ⁽⁹⁵⁾, produciéndose menor proporción de especies reactivas, motivo por el cual, en algunos estudios ⁽¹¹²⁾, el plasma no muestra marcadores positivos de estrés oxidativo.

En niños con sepsis, se ha observado una mayor producción de IL6 e IL8 comparado con pacientes adultos ⁽⁹⁵⁾. Ambas citoquinas pueden producir activación de NF- κ B, pero en menor proporción que TNF- α . Sin embargo, en niños con sepsis, la activación de este factor de transcripción ha sido descrita, incluso con mayores niveles que en adultos, debido a una sinergia entre IL6, IL8 y TNF- α ⁽¹¹³⁻¹¹⁷⁾.

Ambas interleuquinas además producen una activación de NADPH oxidasa, promoviendo la formación de anión superóxido ⁽⁹⁵⁾.

Los niveles de IL6 e IL8 en sangre de recién nacidos con sepsis, han mostrado correlación positiva con retraso mental y psicomotor a la edad de 2 años ⁽¹¹⁸⁾.

2. Hipótesis de trabajo:

La gravedad clínica de pacientes pediátricos con sepsis muestra una correlación positiva con los niveles de biomarcadores de lipoperoxidación y negativa con el potencial antioxidante en sangre.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

Determinar la relación existente entre el estrés oxidativo y la gravedad de la sepsis en pacientes pediátricos.

3.2. Objetivos específicos:

En pacientes pediátricos que ingresan a la Unidad de Cuidados Intensivos por sepsis:

1. Caracterizar el nivel de lipoperoxidación por día de hospitalización.
2. Caracterizar el nivel de potencial antioxidante por día de hospitalización desde el ingreso a UCI.
3. Determinar la asociación de la gravedad clínica de la sepsis con el nivel de lipoperoxidación.
4. Determinar la asociación de la gravedad clínica de la sepsis con el nivel del potencial antioxidante de los pacientes.

4. Metodología:

4.1. Diseño del estudio.

Estudio de tipo prospectivo observacional con una cohorte de pacientes.

Durante el periodo de tiempo comprendido entre enero de 2010 y abril de 2012, se realizó un seguimiento de tres días a los pacientes pediátricos ingresados a la Unidad de Pacientes Críticos del Hospital Roberto del Río, que cumplieran con los criterios de inclusión.

Debido a que no existen en la actualidad para la población pediátrica, parámetros de normalidad para los biomarcadores de estrés oxidativo y de potencial antioxidante, las variables clínicas y de laboratorio fueron registradas durante los primeros tres días consecutivos de hospitalización, para realizar comparaciones según su comportamiento durante su estadía en la unidad de cuidados intensivos.

Las muestras de sangre fueron analizadas para la determinación de biomarcadores de estrés oxidativo y antioxidantes, en el laboratorio de Fisiopatología Renal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Roberto del Río y por el Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

4.2. Pacientes.

El grupo de estudio está formado por pacientes pediátricos (edades comprendidas entre recién nacidos hasta 14 años 11 meses y 29 días) hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos

del Hospital Roberto del Rio y con diagnóstico primario de sepsis. La prevalencia anual de estos pacientes es de aproximadamente 30.

4.3. Criterios de inclusión y exclusión:

- Inclusión: pacientes pediátricos con sepsis o shock séptico diagnosticado según la clasificación actual “*International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics*”⁽¹⁶⁾.
- Exclusión:
 - Pacientes de menos de 5 kilogramos de peso.
 - Diagnóstico conocido de cáncer o enfermedad autoinmune.
 - Pacientes con SIRS de origen no infecciosos (p.e. politraumatizado o gran quemado).
 - Malnutrición severa.
 - Uso reciente de corticoides (menos de 1 mes desde su uso).
 - Insuficiencia renal crónica.

4.4. Medición de la gravedad clínica de los pacientes.

La gravedad clínica de los pacientes fue evaluada principalmente por el score PELOD.

El PELOD score es una herramienta validada para medir la evolución y gravedad del síndrome de disfunción multiorgánica en niños críticamente enfermos, durante los primeros 5 días de hospitalización⁽¹¹⁹⁻¹²¹⁾. Por otra parte, el PELOD ha mostrado una buena predicción de la mortalidad en pacientes pediátricos en diferentes estadios de la sepsis⁽¹¹⁹⁻¹²¹⁾.

Las disfunciones orgánicas analizadas en el score fueron escogidas según el método de Delphi en la base de un descriptor ideal de disfunción orgánica y corresponden a falla: neurológica, cardiovascular, renal, respiratoria, hematológica y hepática. El PELOD entrega puntaje por cada variable de falla sistémica que el paciente presente, en escalas de 0, 1, 10 y 20 puntos por cada variable. Se utiliza la peor respuesta de la variable para la asignación de puntaje de cada órgano. Al final, los pacientes que presentan mayores puntuaciones son los que tienen mayor falla orgánica y se encuentran más graves.

Disfunción orgánica y variable	Sistema de puntuación			
	0	1	10	20
Neurológica				
Escala de coma de Glasgow	12-15	7-11	4-6	3
Reacción pupilar	Ambas reactivas		Ambas fijas	
Cardiovascular				
Frecuencia cardíaca (lpm)				
< 12 años	<195		>195	
> o = 12 años	≤ 150		>150	
Presión arterial sistólica (mmHg)				
<1 mes			35-65	<35
1 mes-1 años	>65		35-75	<35
1-12 años	>75		45-85	<45
≥ 12 años	>85		55-95	<55
Renal				
Creatinina (uMol/L)				
<7 días			≥ 1,59	
7 días-1 año			≥ 0,62	
1-12 años	<1,59		≥ 1,13	
≥ 12 años	<0,62		≥ 1,59	
Respiratorio				
PaO ₂ / FiO ₂	<1,13		≤ 70	
PaCO ₂	<1,59		> 90	
Ventilación mecánica		Si		
Hematológico				
Leucocitos (x 10 ⁹ /L)	>70			
Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	< 90	1,5-4,4	<1,5	
	No	≤ 35		
Hepático				
SGOT (UI/L)		≥ 950		
Tiempo de Protrombina (o INR)	≥ 4,5	≥ 60 (> 1,4)		
	≥ 35			
	< 950			
	>60 (<1,4)			

Tabla 2. Sistema de puntuación del score PELOD. A cada variable se le asigna el puntaje de la peor respuesta obtenida. PaO₂= presión arterial de O₂, FiO₂ = fracción inspirada de O₂. SGOT= transaminasa glutámico-oxalacética.

Los pacientes fueron tratados de acuerdo a los protocolos de UCI y diariamente se

evaluaron según parámetros de disfunción orgánica y score PELOD. No se les administró ningún tipo de antioxidante.

Se consideró además, el requerimiento y días de uso de drogas vasoactivas y de ventilación mecánica, así como también los días de hospitalización, como otras variables de gravedad clínica.

Los pacientes no fueron seguidos después de su egreso de la Unidad de Pacientes Críticos ya que se ha demostrado que tal seguimiento no es necesario, puesto que la mayoría evoluciona favorablemente. Un estudio al respecto mostró que de 341 egresos de UCI pediátrica, sólo 3 (0,9%) fallecen ⁽¹²²⁾.

4.5 Análisis estadístico y cálculo del tamaño muestral.

Los resultados están expresados como promedio \pm error estándar para variables continuas. Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad en la distribución de las variables, debido a que la muestra es menor de 40 individuos.

Para buscar diferencias significativas en las variables estudiadas, entre los días de hospitalización de los pacientes, se utilizó la prueba ANOVA para medias repetidas con un análisis *post hoc* de Tukey si su distribución fue normal.

Las variables con distribución no paramétrica, fueron comparadas mediante el test de Friedman y análisis *post hoc* de Dunn's.

El análisis de correlación entre variables por día de estadía fue llevado a cabo mediante el test de Pearson o Spearman según la distribución de las variables.

Para comparar las diferencias entre los biomarcadores y uso de drogas vasoactivas y ventilación mecánica, se realizó un contraste de hipótesis mediante una prueba U de Mann Whitney.

Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

Para el análisis se utilizó el software IBM SPSS Statics 20. Para la confección de gráficos se utilizó el software Graph Pad Prism 6.

El cálculo del tamaño de la muestra fue realizado en base a la variación observada en la relación GSH/GSSG en pacientes sépticos obtenida en el segundo día posterior al ingreso a la UCI. Se observó una diferencia porcentual entre ambos días de un 36%, con un error alfa de 5% y un poder estadístico del 80%. El resultado señaló 31 pacientes para estimar diferencias estadísticamente significativas. Se utilizó para este cálculo el software Win Episcopo 2.0.

4.6. Obtención de muestras de sangre de los pacientes:

Posterior a la obtención del Consentimiento Informado, se obtuvieron las muestras diarias de 4 mL de sangre en tubos con EDTA como anticoagulante y refrigeradas a -80° C.

Posteriormente la muestra fue separada en elementos figurados y plasma, en centrífuga clínica, a una velocidad de 1000 g por 15 minutos, a fin de extraer el plasma para la determinación de: capacidad antioxidante total ⁽¹²³⁾, ácido úrico ⁽¹²⁴⁾ y nivel de lipoperoxidación. Los eritrocitos restantes fueron lavados con suero fisiológico y hemolizados mediante shock hipotónico de agua bidestilada, para medición del resto de los biomarcadores.

4.7. Determinación de biomarcadores:

A.- Potencial antioxidante:

- Extracelular

La capacidad antioxidante del plasma fue medida mediante la cuantificación espectrofotométrica de la habilidad reductora de las sustancias antioxidantes presentes en el plasma capaces de reducir el ion férrico (Fe^{+3}) a ferroso (Fe^{+2}) (FRAP, ferric reducing ability of plasma) ⁽¹²³⁾. La reducción del complejo Ferrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) a Ferroso Fe^{2+} , fue determinado por espectrofotometría a 594 nm.

El valor FRAP se corrigió con el valor del ácido úrico de los pacientes, el cual es un componente importante de dicha capacidad antioxidante (un tercio aproximado), quedando así la capacidad antioxidante plasmática reflejada por otras sustancias como la albúmina, bilirrubina, vitaminas A, C y E entre otros.

-Intracelular

Los niveles intracelulares en eritrocitos de glutatión reducido y glutatión oxidado fueron determinados por fluorimetría en hemolizado de glóbulos rojos, en presencia de fluoróforo O-Oftaldehído (OPT) a 420 nm. La escala de medición es en $\mu\text{mol/g}$ de hemoglobina. Se utilizó N-etilmaleimida (NEM) para prevenir la oxidación de GSH a GSSG. La relación se expresó dividiendo el valor numérico de cada componente, como relación GSH/GSSG ⁽¹²⁵⁾. Se normalizó por concentración de hemoglobina.

B.- Actividad de las enzimas antioxidantes en el eritrocito

La actividad de SOD está basada en la medición de la inhibición de la autooxidación de adrenalina en adrenocromo en solución acuosa alcalina, detectándose un producto cromóforo con máxima absorbancia a 480 nm. Una unidad de SOD (U) se define como el nivel de actividad que reduce a la mitad la autooxidación basal expresado en U/gramo de hemoglobina (Hb) ⁽¹²⁶⁾.

La actividad de CAT se determinó por ensayo cinético de la degradación del peróxido de hidrógeno a 240 nm. La diferencia en extinción por unidad de tiempo es una medida de la actividad de catalasa. Esta actividad se expresa basándose en la constante de la reacción de primer orden (k)/mg de hemoglobina ⁽¹⁰⁾.

La actividad de GSH-Px se obtuvo por espectrofotometría basándose en la reducción de glutatión oxidado acoplada a la oxidación de NADPH por la glutatión reductasa. La unidad de la GSH-Px es definida como la actividad que oxida 1 μ mol de NADPH por minuto. El progreso y la cinética de la reacción pueden ser monitorizados por medición del consumo de NADPH (absorbe a 340 nm). La estequiometría es de 1:2, es decir, cuando se consume 1 mol de NADPH es porque se han oxidado 2 moles de glutatión. La actividad se expresa en U/mg de Hb ⁽¹²⁷⁾.

C. Biomarcador de estrés oxidativo:

Se registró como producto de estrés oxidativo, el nivel de lipoperoxidación, mediante la medición en plasma de F2 Isoprostanos con técnica de ELISA. (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). El ensayo se basa en la competición entre 8-isoprostano y 8-isoprostano-

acetilcolinesterasa (AChE) como trazador, utilizando antisuero 8-isoprostano de conejo. Se produce un color amarillo con una absorbancia a 412 nm.

5. Resultados.

5.1. Características clínicas de los pacientes:

En el periodo de seguimiento de este estudio, se reclutaron 18 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión. 7 fueron de sexo masculino y 11 femenino. La edad promedio de los pacientes fue de 2 años y 6 meses, con rango entre los 30 días y 10 años 9 meses.

Los pacientes permanecieron en promedio 7,6 días hospitalizados, con un rango de 3 a 18 días.

El foco primario de infección pudo ser identificado en 16 pacientes. Figura 3.

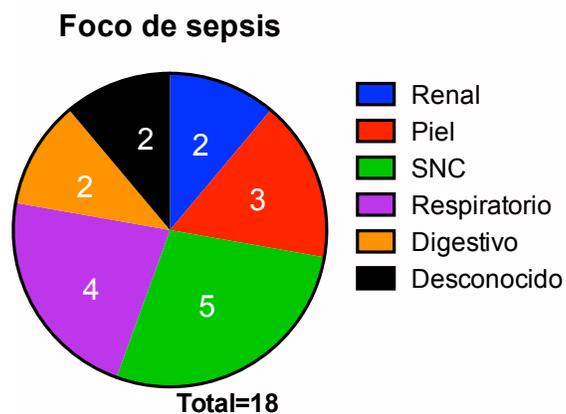


Figura 3. Foco del cuadro séptico en el grupo de pacientes del estudio.

5.2. Caracterización del nivel de lipoperoxidación por día de hospitalización:

Los niveles de F2 isoprostanos fueron determinados durante 3 días de estadía de los pacientes.

Los promedios diarios observados fueron: 22,4 ($\pm 3,5$) en el día 1, 27 ($\pm 3,9$) en el día 2 y 24,6 ($\pm 4,1$) en el día 3. No se observó diferencia significativa entre estos valores diarios $p=0,84$.

Figura 4.

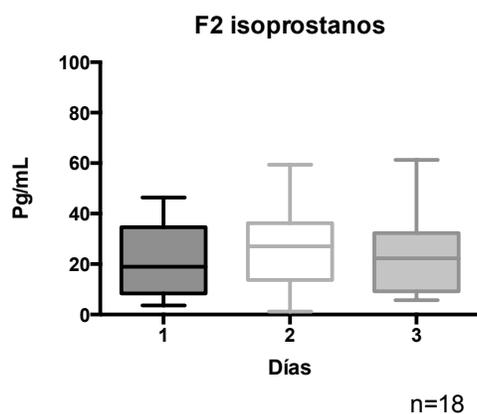


Figura 4. Comportamiento del nivel de lipoperoxidación en el grupo de pacientes. El nivel de lipoperoxidación se evaluó mediante la técnica de medición de F2-isoprostanos en plasma. No se observaron diferencias significativas diarias $p=0,84$.

En total 7 pacientes presentaron valores de F2-isoprostanos de ingreso por sobre el promedio, con diferencias en los otros biomarcadores que no fueron estadísticamente significativas al compararlas con los pacientes con menor promedio de isoprostanos al ingreso. Tabla3

Grupo	SOD	CAT	GSH-PX	GSH/GSSG	GSH	FRAP	PELOD
1	136	245	4,2	3	1,4	284	12
0	153	298	5,2	6,4	2,7	240	6

Tabla 3. Comparación de biomarcadores entre pacientes que ingresaron con isoprostanos sobre el promedio (grupo 1) versus aquellos que ingresaron con isoprostanos bajo el promedio (grupo 0). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos

5.3. Caracterización del potencial antioxidante por día de hospitalización:

El potencial antioxidante fue evaluado midiendo la actividad, en glóbulos rojos, de cada una de las siguientes enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Además se evaluó con la medición de la relación entre glutatión reducido y oxidado en glóbulos rojos, y por último, mediante la medición de la capacidad reductora de ion férrico del plasma.

Los promedios diarios obtenidos de los biomarcadores antioxidante pueden verse en la tabla 4.

Componente	Promedios diarios		
	Día 1	Día 2	Día 3
FRAP	263,4(±26,9)	248,9(±23,2)	229,0(±25,1)
SOD	141,8(±6,3)	148,9(±5,8)	163,0(±9,6)
CAT	263,3(±15,0)	291,1(±18,5)	337,5(±21,1)
GPx	4,5(±0,3)	4,6(±0,2)	5,0(±0,3)
GSH/GSSG	4,4(±1,2)	3,2(±0,5)	3,9(0,6)

Tabla 4. Promedios y errores estándar de los biomarcadores de antioxidantes del grupo de pacientes, durante los tres días de seguimiento.

FRAP: muestra una tendencia a la disminución en el transcurso de la hospitalización. Esta disminución fue significativa entre el día 1 y 3 ($p=0,008$). Sin diferencia significativa en el descenso del potencial observado entre el día 1 y 2 ($p=0,95$) y día 2 y 3 ($p=0,13$)

SOD: la actividad enzimática mostró un aumento en el transcurso de la hospitalización, la cual fue significativa al comparar el día 1 y el día 3 ($p=0,02$). No se observaron diferencias significativas al comparar el día 1 con el 2 ($p=0,54$) ni en el día 2 con el 3 ($p=0,55$).

CAT: esta enzima muestra una tendencia al incremento de su actividad durante el transcurso de la hospitalización. Hubo diferencias significativas en los aumentos de actividad observados

entre el día 1 y 3 ($p=0,003$) y entre los días 2 y 3 ($p=0,001$). Sin diferencias significativas entre el día 1 y 2 ($p=0,17$).

GSH-Px: Se observa una tendencia al alza en la actividad enzimática a medida que transcurren los días de hospitalización. Esta tendencia es significativa entre el día 1 y 3 ($p=0,02$). No hubo diferencias significativas entre los días 1 y 2 ($p=0,83$) y días 2 y 3 ($p=0,34$).

GSH/GSSG: Se observa un descenso significativo de la relación al segundo día ($p=0,04$) y un posterior aumento no significativo al tercer día ($p=1$).

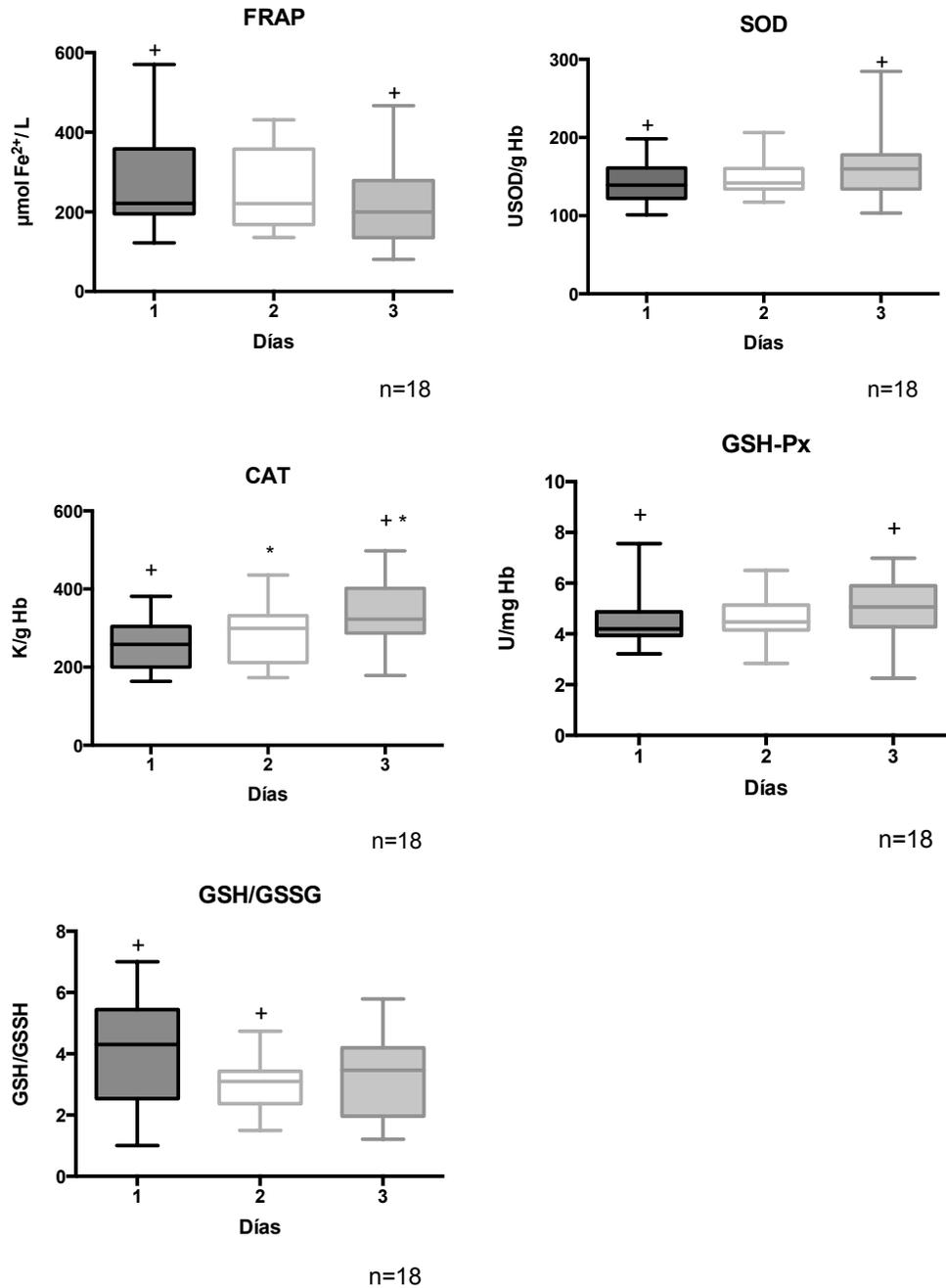


Figura 5. Comportamiento de los biomarcadores de antioxidantes en el grupo de pacientes. Las barras representan promedios, errores estándar y rangos observados. + y * representan diferencias significativas, $p \leq 0,05$. Se observó una disminución en el FRAP al día 3 versus el día 1, $p=0,008$. SOD aumentó en el día 3 en comparación con el día 1, $p=0,02$. CAT mostró mayor actividad en el día 3 al compararlo con el día 1 y 2, $p=0,001$ y $<0,001$ respectivamente. GSH-Px mostró un aumento en el tercer día respecto del día 1, $p=0,02$. GSH/GSSG mostró una disminución al segundo día respecto del día 1, $p=0,04$.

5.4. Comportamiento de los biomarcadores por grupos etarios:

Los pacientes fueron agrupados como recién nacidos (0 a 28 días), lactante menor (29 días a 11 meses y 29 días), lactante mayor (1 año hasta el año 11 meses y 29 días), preescolar (2 a 5 años) y escolares (6 a 14 años). En el grupo de recién nacidos no hubo pacientes. El grupo de lactantes menores estuvo conformado por 6 pacientes, el de lactantes mayores por 6 pacientes, el de preescolares por 4 pacientes y el de escolares por 2 pacientes. No se realizaron análisis estadísticos para observar diferencias significativas ya que los grupos están compuestos por muy pocos pacientes. Figura 6.

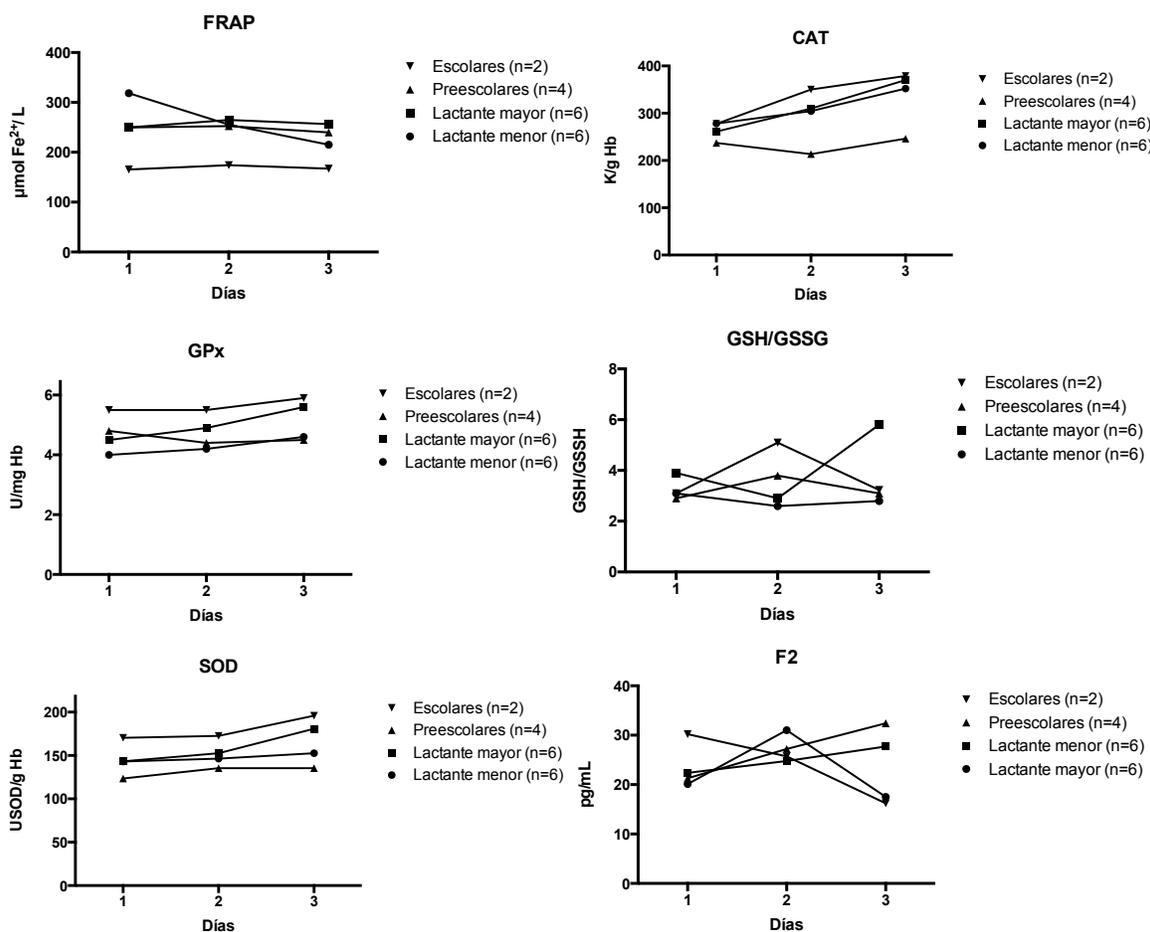


Figura 6. Comportamiento de los biomarcadores de estrés oxidativo y potencial antioxidante por grupos de edad de los pacientes. No se observaron diferencias significativas debido al bajo número de pacientes en cada grupo.

5.5. Asociación de la gravedad clínica de la sepsis con el nivel de lipoperoxidación.

PELOD score: los promedios diarios del score en el total de los pacientes fue de 9,4(±1,6) en el día 1, 5,8(±1,7) en el día 2 y 2,9(±1,2) en el día 3. El descenso del puntaje observado entre los días 1 y 2 no fue significativo (p=0,09) ni tampoco entre los días 2 y 3 (p=0,5). La disminución observada entre el día 1 y 3 fue significativa (p=0,001). Esto quiere decir que los pacientes al tercer día se encontraban con menor falla orgánica múltiple que al ingreso, por lo tanto, menos graves. Figura 7.

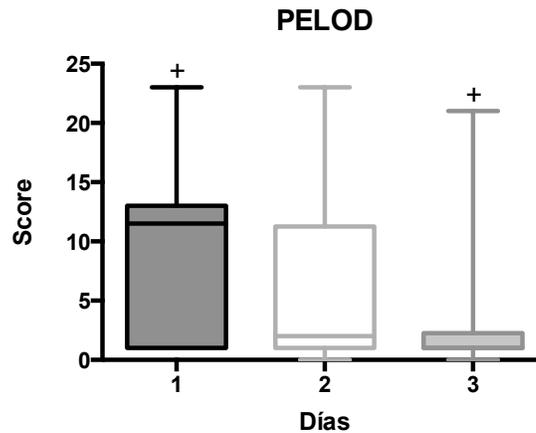


Figura 7. Comportamiento del score PELOD en el grupo de pacientes de acuerdo al seguimiento realizado en 3 días. Se observó una disminución en el score en el día 3 en comparación con el día 1, p=0,001. + significa diferencias significativas con $p \leq 0,05$.

Correlación entre el score PELOD y F2 isoprostanos: no se observó correlación significativa. Tabla 5.

	Día 1	Día 2	Día 3
F2-isoprostanos	p=0,29; r=-0,2	p=0,51; r=-0,15	p=0,38; r=-0,09

Tabla 5. Correlación entre el nivel de lipoperoxidación y el PELOD por día de seguimiento. No se observaron correlaciones significativas.

Los pacientes que requirieron el uso de drogas vasoactivas presentaron un valor promedio más elevado de F2-isoprostanos que aquellos que no las requirieron (76,5 versus 38; $p=0,004$).

No se observó diferencias en el nivel de F2-isoprostanos entre pacientes que requirieron uso de ventilación mecánica en comparación a aquellos que no requirieron.

Tampoco se observó correlación entre el nivel de isoprostanos y los días de estadía en UCI.

5.6. Asociación de la gravedad clínica de la sepsis con el nivel del potencial antioxidante de los pacientes.

Correlación entre PELOD score y el nivel antioxidante de los pacientes: las correlaciones significativas se encontraron entre el nivel de actividad de catalasa en el día 1 y el PELOD, con una correlación negativa, esto quiere decir que los pacientes más graves presentaron un valor menor de actividad de catalasa al ingreso.

La otra correlación significativa encontrada fue en la relación GSH/GSSG en el día 3 y el PELOD, con una correlación positiva, esto significa que los pacientes más graves presentaron mayor relación GSH/GSSG. Tabla 6 y figura 8.

Biomarcador	Día 1	Día 2	Día 3
SOD	$p=0,41$; $r=-0,33$	$p=0,76$; $r=0,06$	$p=0,13$; $r=0,37$
CAT	$p=0,04$; $r=-0,49$	$p=0,87$; $r=-0,04$	$p=0,99$; $r=0,001$
GPx	$p=0,78$; $r=-0,07$	$p=0,65$; $r=-1,16$	$p=0,39$; $r=0,22$
GSH/GSSG	$p=0,75$; $r=0,08$	$p=0,99$; $r=-0,004$	$p=0,003$; $r=0,66$
FRAP	$p=0,94$; $r=-0,02$	$p=0,06$; $r=0,45$	$p=0,54$; $r=0,15$

Tabla 6. Correlación entre los biomarcadores de estrés oxidativo y el score PELOD. En negrita valores significativos. Se observó una correlación negativa entre CAT y PELOD al día 1, y una correlación positiva entre GSH/GSSG y PELOD al día 3.

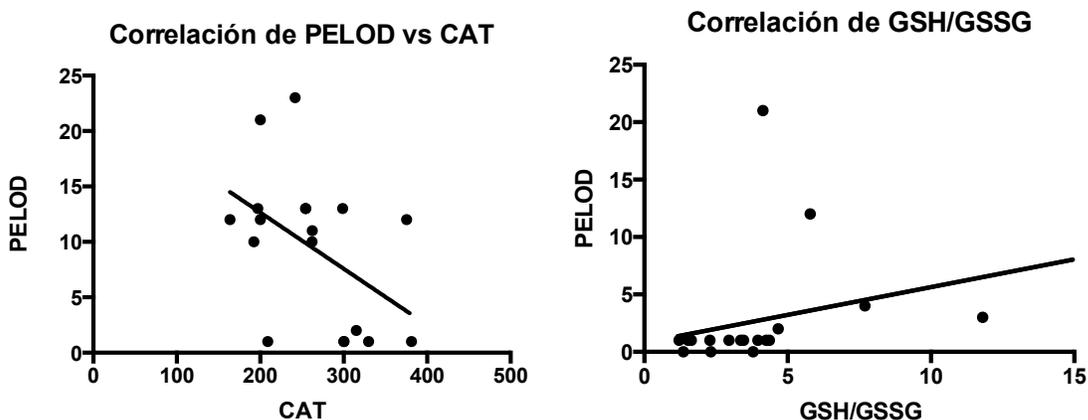


Figura 8. Correlaciones entre CAT y PELOD en el día 1 (izquierda) y GSH/GSSG y PELOD en el día 3 (derecha). Se observó una correlación negativa entre CAT y PELOD ($p=0,04$, $r=-0,49$) y positiva entre GSH/GSSG y PELOD ($p=0,003$, $r=0,66$).

Al buscar diferencias entre los pacientes que requirieron de drogas vasoactivas y aquellos que no, con los biomarcadores de estrés oxidativo, se encontró que aquellos usuarios de drogas vasoactivas presentaron niveles menores de actividad de glutatión peroxidasa ($p=0,02$) y de FRAP ($p=0,004$). El resto de los biomarcadores no mostró diferencias significativas.

No se observó diferencias en los niveles de biomarcadores entre los pacientes que requirieron ventilación mecánica invasiva y aquellos que no requirieron.

Los pacientes que debieron permanecer más días hospitalizados presentaron menor actividad de la enzima catalasa al ingreso, ya que ésta enzima se correlacionó de manera negativa con los días de estadía. ($p=0,02$, $r= -0,3$). Figura 9.

Correlación entre CAT día 1 y días en UCI

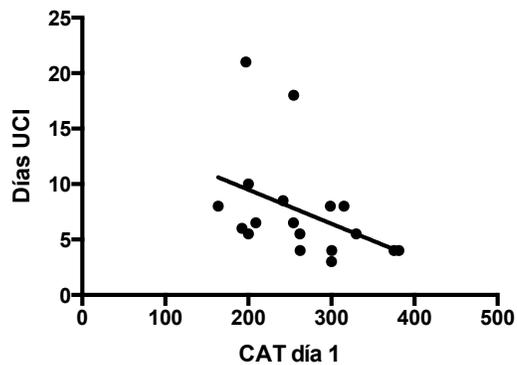


Figura 9. Correlación entre la actividad de CAT en el día 1 y los días de estadía del grupo de pacientes en UCI. Se observó una correlación negativa, esto quiere decir que los pacientes que requirieron más días de hospitalización presentaron menores niveles de actividad de CAT.

Al separar las fallas orgánicas agrupadas en el score PELOD y ver si aquellos pacientes que presentaban compromiso sistémico tenían diferentes valores de biomarcadores que aquellos que no presentaron falla sistémica, se obtuvieron los siguientes resultados:

Los pacientes que presentaron falla hepática presentaron valores mayores de actividad de la enzima glutatión peroxidasa (5,5 versus 4,2, $p=0,03$), mayor actividad de la enzima SOD (191,6 versus 144,2, $p=0,02$) y mayor relación GSH/GSSG (6,1 versus 3, $p=0,02$).

Los pacientes con falla hematológica, presentaron valores mayores de la relación GSH/GSSG (8 versus 3,2, $p=0,01$).

6. Discusión

Los estudios de estrés oxidativo en sepsis, elaborados hasta la fecha, son discordantes entre sí, ya que por un lado hay datos que muestran un aumento del nivel de lipoperoxidación y estrés oxidativo junto con una disminución del potencial antioxidante. Por otro lado, hay datos que muestran lo contrario. Chuang et al ⁽¹²⁸⁾, encontró que un aumento de la capacidad antioxidante plasmática total en pacientes con sepsis, es un marcador de mal pronóstico. Doise et al ⁽⁸⁴⁾, no encontraron diferencias en la capacidad antioxidante total del plasma entre pacientes con sepsis severa y shock séptico.

En niños, Cherian et al ⁽¹¹²⁾, no observó diferencias en los niveles de GSH, SOD y TBARS en pacientes con sepsis comparados con un grupo control de niños sanos.

Estas diferencias observadas, más que ser contradictorias, pueden deberse a varios motivos:

(i) Las técnicas y tipos de muestra empleados en las mediciones. Los valores obtenidos de la medición de biomarcadores de estrés oxidativo, no son comparables si se miden en plasma, orina, glóbulos rojos o tejido. A nivel celular es en donde ocurre gran parte del daño oxidativo (lipoperoxidación, daño en el DNA y proteínas). La generación de especies reactivas ocurre rápidamente y estas presentan, en general, una vida media muy corta ⁽⁴⁾. Niveles elevados de biomarcadores en plasma reflejan que un proceso oxidativo que se originó en un tejido específico, está produciendo una respuesta oxidativa generalizada en el organismo, ya que las células inflamadas extravasan sus componentes al plasma. En el caso del ciclo GSH/GSSG, éste último es eliminado por las células cuando su concentración intracelular se eleva. En este caso, niveles plasmáticos elevados de GSSG o una relación GSSG/GSH elevada, traducen estrés oxidativo ⁽⁸⁹⁾.

En el caso de la sepsis, en que por definición hay una respuesta inflamatoria sistémica, la medición en plasma y glóbulos rojos parece ser la más acertada.

La importancia de la técnica de medición empleada, ha sido mencionada en el caso de los F2-isoprostanos, en donde la medición por espectrometría de masa ha mostrado ser más confiable y precisa que las técnicas de inmunoensayo ⁽¹²⁹⁾.

(ii) Tiempo de medición. Si las muestras son tomadas al ingreso del paciente a la unidad de cuidados intensivos o unos días después de evolucionado el cuadro, en especial después de haber recibido alimentación, oxígeno y medicamentos, los valores de los biomarcadores van a variar, debido a que la enfermedad y el proceso de respuesta oxidativa, son un continuo en el tiempo y el momento de obtención de la muestra es una foto del estado en el cual fue obtenida.

En la fisiopatología de la sepsis se ha descrito un estallido inflamatorio inicial muy intenso, seguido de una respuesta antiinflamatoria tardía marcada. En este contexto, lo ideal para estudiar a estos pacientes es seguirlos en el tiempo y no elaborar conclusiones con datos obtenidos en una sola medición.

Niveles bajos de antioxidantes pueden deberse a su utilización y disminución del estrés oxidativo, o a una falla en su generación por agotamiento energético.

En el presente estudio, los 18 pacientes estudiados corresponden a una muestra importante, no fue necesario completar el número calculado de 31 pacientes para obtener diferencias estadísticamente significativas en la relación GSH/GSSG. Sin embargo, sería de gran interés

ampliar la muestra de pacientes de este estudio, para lo cual se recomienda el trabajo colectivo de otros centros de cuidados intensivos pediátricos.

El promedio de edad de los pacientes concuerda con la edad más común de los pacientes hospitalizados en una UCI pediátrica y pese a que al separar las variables estudiadas por grupos etarios no se pudo extraer conclusiones significativas, 2 pacientes escolares presentaron mayor gravedad clínica comparado con el resto de los grupos. Esto puede estar en el contexto del azar o de que efectivamente los pacientes de mayor edad evolucionaron menos favorablemente, ya que su manejo tiende a ser menos agresivo desde un comienzo, comparado con el del lactante.

El foco principal de origen neurológico de la sepsis, no concuerda con lo descrito en la literatura, en donde destaca como principal foco infeccioso el respiratorio, seguido de infecciones cutáneas y en tercer lugar las de origen neurológico ⁽¹³⁰⁾. Atribuyo esta diferencia al bajo número de pacientes reclutados.

En el caso del foco no determinado en el 11% de los pacientes, muchas veces puede ocurrir que este foco se haya resuelto quedando la bacteremia y moléculas inflamatorias, generando el cuadro séptico, o que efectivamente no haya podido ser determinado por resultados negativos de los cultivos de orina, LCR, deposiciones, aspirado bronquial, etc. Esto se relaciona con el hecho de que en la génesis de la sepsis, más que el patógeno en sí, tiene mayor determinación la respuesta inflamatoria-oxidativa del paciente.

El que no hayamos observado mortalidad de los pacientes de este estudio, puede deberse a una muestra pequeña y menor mortalidad en pacientes pediátricos.

La medición del nivel de lipoperoxidación mediante técnica de F2-isoprostanos, no mostró variación significativa durante la estadía hospitalaria de los pacientes. Esto no quiere decir que la lipoperoxidación no se relacione con la gravedad clínica de la sepsis, ya que para tal afirmación sería necesario utilizar otro biomarcador de lipoperoxidación (TBARS, MDA o isofluoranos).

La falta de correlación entre severidad de la sepsis y el nivel de isoprostanos, puede ser debida al bajo número de pacientes que este estudio obtuvo, o debido a que efectivamente los isoprostanos no muestran un comportamiento asociable al cuadro clínico de pacientes pediátricos con sepsis, debido a que su producción no es específica del estrés oxidativo.

Se ha visto que estos pueden ser producidos por plaquetas, independiente del nivel de estrés oxidativo del organismo, actuando en este caso como artefactos ⁽¹³⁾. Por otra parte, la vida media de los F2-isoprostanos es de aproximadamente 150 minutos, después de los cuales se vuelve a valores plasmáticos normales de 5 a 40 pg/mL ⁽¹³¹⁾.

Durante los tres días de estudio, los pacientes mejoraron su estado clínico de acuerdo a la disminución observada en el score PELOD al tercer día respecto del día 1. Esto es algo esperable en el contexto del manejo intensivo que se realiza en la UCI del Hospital Roberto del Río.

Las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GSH-Px mostraron un aumento de actividad de acuerdo a la mejoría clínica de los pacientes, pudiendo esto deberse a que mayor nivel de antioxidantes ayudan al proceso de recuperación de los pacientes, disminuyendo sus niveles de estrés oxidativo.

La capacidad antioxidante plasmática total, medida como FRAP, es una herramienta de difícil interpretación debido a sus múltiples y algunos desconocidos componentes que posee. La disminución de los valores de FRAP observados al tercer día, cuando los pacientes se encontraban menos grave, puede deberse a que esos pacientes utilizaron como primera línea defensiva los antioxidantes plasmáticos. Kapoor et al ⁽⁹²⁾, observaron una disminución del nivel de ácido úrico y albúmina (antioxidantes plasmáticos) en recién nacidos con sepsis.

El trabajo de Doise et al ⁽⁸⁴⁾, también mostró una disminución del potencial antioxidante total del plasma en el transcurso de 10 días de hospitalización de los pacientes, sin embargo no vieron asociación con la gravedad clínica de los pacientes.

Chuang et al ⁽¹²⁸⁾, obtuvo niveles mayores de la capacidad antioxidante plasmática en pacientes no sobrevivientes de sepsis y lo atribuyó a una exagerada respuesta antioxidante ante un estrés oxidativo propagado o a un mecanismo compensatorio por la depleción de otros antioxidantes. Otra causa de este aumento, puede ser debida a mayor elevación del ácido úrico en pacientes con deterioro de la función renal o que presenten isquemia y reperfusión con activación de XO y generación de ácido úrico. Por este motivo nuestra metodología implicó la medición independiente de esta variable y la posterior corrección del FRAP.

Del mismo modo, valores disminuidos de FRAP pueden atribuirse a una disminución de la albuminemia en el contexto de una sepsis severa con desnutrición o falla hepática.

Observamos que los pacientes que requirieron de drogas vasoactivas en el transcurso de su estadía en UCI, presentaron significativamente valores menores de FRAP. En este caso, el

uso de drogas vasoactivas implica inestabilidad hemodinámica la cual se asocia a mayor gravedad clínica. Sin embargo este parámetro no fue medido en el tiempo por lo que la disminución de FRAP en estos pacientes puede deberse a mayor utilización de antioxidantes plasmáticos, síntesis más tardía o interacción de alguna sustancia plasmática con las drogas vasoactivas utilizadas. Para poder tener mayor certeza sería recomendable disponer de valores promedios de FRAP en niños sanos.

El índice tiólico o relación GSH/GSSG disminuyó al segundo día, sin embargo al tercer día su comportamiento fue errático y no mostró variación significativa.

GSH es el antioxidante intracelular de primera línea por excelencia. Una vez utilizado y oxidado a GSSG, es reciclado a GSH por acción de las enzimas glutatión reductasa y GSH-Px, o eliminado al plasma donde es sustrato de las mismas enzimas, pudiendo incorporarse como GSH a las células ⁽⁸⁸⁾.

Nuestra medición en glóbulos rojos traduce el estrés oxidativo vivido por estos elementos figurados que no pueden sintetizar más GSH y deben trabajar con el disponible en su interior o el que pueden incorporar desde el plasma o tejidos vecinos. Cuando se observa una disminución en la relación GSH/GSSG quiere decir que se está en presencia de un mayor estrés oxidativo, como el observado al día dos versus el día uno. Como no hubo disminución significativa del PELOD en el día 2, no podemos relacionarlo con la gravedad de los pacientes al segundo día, sólo que disponían de menos GSH y más GSSG eritrocitario (la variación observada en GSH/GSSH en nuestro estudio se debió tanto a una disminución en GSH como a un aumento de GSSG).

Pastore et al ⁽⁷⁾, realizaron mediciones de GSH/GSSG en 227 niños sanos entre 0 y 15 años, obteniendo un valor promedio de 8,7 lo cual es mayor a nuestros valores promedios de 4,4 en el día 1, 3,3 en día 2 y 3,9 en el día 3. Esta disminución observada en nuestros pacientes podemos interpretarla como un mayor nivel de estrés oxidativo en pacientes con sepsis.

La correlación positiva observada entre el índice tiólico y el PELOD al tercer día se debe principalmente a que los pacientes con falla hepática y falla hematológica presentaron mayores valores de GSH/GSSG en ese momento. Esto sugiere que los pacientes más graves, presentaban mayores niveles de GSH, pudiendo esto deberse a que en ese grupo de pacientes se gatilló una respuesta antioxidante mayor que la de los pacientes con mejor cuadro clínico.

La falla hepática es considerada un evento temprano en el desarrollo de la sepsis en adultos, sin embargo en niños es algo poco frecuente.

En el PELOD Score la falla hepática se evaluó como una protrombina plasmática menor a 60% , lo cual es inespecífico ya que se ve con frecuencia y múltiples patologías como en trauma, en niños la insuficiencia hepática es más rara.

La falla hepática implica un desbalance en la expresión génica vasoreguladora hepática ⁽³⁰⁾. Por otra parte, en animales con sepsis, se ha observado un aumento de la síntesis y utilización de GSH ⁽¹³²⁾ el cual es sintetizado en todas las células, pero principalmente en hígado. Su síntesis es regulada por un *feed back* negativo sobre la enzima gama glutamilcisteína sintetasa, por lo que niveles previos bajos de GSH estimulan a esta enzima para que más GSH sea sintetizado. Debido a esto, los niveles medidos en un tiempo preciso

(tercer día) sumado a que los valores en el tercer día no fueron diferentes ni al primer ni segundo día, sugieren que esta correlación hay que interpretarla con cautela.

El comportamiento de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GSH-Px, fue de aumentar su actividad en el transcurso de la estadía, en especial al tercer día, todas mostraron mayores valores respecto al día uno.

Los niveles de GSH-Px están en directa relación con los niveles plasmáticos de selenio, el cual se ha visto en menor proporción al comienzo de la fase inflamatoria de la sepsis, aumentando posteriormente junto con la recuperación del cuadro inflamatorio ⁽¹³³⁾. En el presente estudio, al tercer día los pacientes estaban menos graves, por lo que podrían disponer de mayor cantidad de selenio para la síntesis y actividad de GSH-Px.

En el trabajo de Mishra et al, 2007 ⁽⁸⁸⁾, observaron que en el transcurso de la hospitalización de su grupo de pacientes con sepsis, estos presentaban mayor actividad de GSH-Px plasmática, tanto en el grupo que recibió aporte de selenio como en el que no recibió. No observaron cambios en la actividad de la GSH-Px de glóbulos rojos durante la estadía hospitalaria. El aporte de selenio se correlacionaba con el score SOFA (de manera inversa) y directamente con la actividad de GSH-Px plasmática, no así con la actividad de GSH-Px en glóbulos rojos. Esta falta de variabilidad enzimática en glóbulos rojos lo atribuyen a que la formación de GSH-Px en eritrocitos es más lenta que en plasma.

Por otra parte, observamos que los pacientes que requirieron del uso de drogas vasoactivas, presentaron promedios menores de actividad de GSH-Px, pudiendo relacionarse esto a la mayor gravedad e inflamación de estos pacientes, con menores niveles de selenio. Sería

interesante analizar en un próximo estudio, los niveles de selenio de los pacientes pediátricos con sepsis.

En los pacientes que presentaron falla hepática, en el día 1 y día 3, se observó niveles elevados de actividad de GSH-Px. Esto puede ser interpretado en el contexto de que la falla hepática es un evento temprano en sepsis, y aun no hay alteración de la actividad de GSH-Px, ya que ésta se sintetiza principalmente a nivel renal ⁽³⁰⁾. Lo anterior se relaciona con que los pacientes con falla hepática presentaron además mayores valores de GSH, el cual es un cofactor, al igual que el selenio, para la actividad enzimática de GSH-Px.

El grupo de pacientes con falla hepática también tuvo niveles mayores de actividad enzimática de SOD eritrocitaria, pudiendo ser esto una respuesta antioxidante ante el daño hepático, al igual que el aumento de GSH y GSH-Px.

CAT mostró una correlación negativa al ingreso con PELOD, significando esto que los pacientes que ingresaban en peores condiciones clínicas, mostraban menores valores de actividad enzimática. Otra correlación negativa de CAT fue con el número de días de estadía de los pacientes, de este modo los pacientes que más días estuvieron hospitalizados, presentaron menores valores de actividad de CAT. Esto nos lleva a concluir que la catalasa es una enzima que se correlaciona con la gravedad y estadía de los pacientes.

Los datos obtenidos en este estudio, concuerdan con los de Kapoor et al ⁽⁹²⁾, quienes observaron mayores valores plasmáticos de SOD CAT y GSH-Px en pacientes recién nacidos con sepsis comparados con el grupo control de recién nacidos sanos.

También Batra et al ⁽⁹¹⁾, obtuvieron resultados similares, ya que encontraron mayores niveles plasmáticos de SOD y GSH-Px en recién nacidos con sepsis versus su grupo control de recién nacidos sanos.

Sin embargo, Cherian et al ⁽¹¹²⁾, no observó diferencias en la actividad eritrocitaria de SOD en niños con sepsis, comparados con un grupo control de niños sanos.

Pese al aporte que entrega el presente estudio para un área poco explorada en pediatría, aun quedan variables por medir, tanto de estrés oxidativo (daño en proteínas, daño en DNA y otras técnicas de medición de lipoperoxidación), y en antioxidantes (vitaminas, selenio, albúmina), así también otras variables de gravedad y evolución clínica (PCR, mortalidad) para comprender el rol que desempeña el estrés oxidativo en los pacientes pediátricos con sepsis.

Estudios de intervención terapéutica con antioxidantes en niños, no se han descrito hasta la fecha y sería interesante llevarlos a cabo, ya que la evidencia hasta ahora, apunta a un rol fundamental del estrés oxidativo en la fisiopatología de la sepsis, principalmente al inicio del cuadro.

7. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio permiten afirmar que la enzima catalasa, es buen indicador de la gravedad clínica de los pacientes pediátricos con sepsis.

8. Bibliografía

1. Miller, D. M., Buettner, G. R., Aust, S. D. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic. Biol. Med.* 1990; 8:95–108.
2. von Dessauer B, Bongain J, Molina V, Quilodrán J, Castillo R, Rodrigo R.J. Oxidative stress as a novel target in pediatric sepsis management. *Crit Care.* 2011; 26:103.e1-7
3. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and 57 human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39:44-84.
4. Lemineur T, Deby-Dupont G, Preiser JC. Biomarkers of oxidative stress in critically ill patients: what should be measured, when and how?. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006 Nov; 9(6):704-10.
5. Cadenas, E., & Davies, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 2000;29:222–230.
6. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin Chem.* 2006; 52:601-623.
7. Pastore A, Piemonte F, Locatelli M, Lo Russo A, Gaeta LM, Tozzi G, Federici G. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clin Chem.* 2001; 47:1467-1469.
8. Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, Ming-Yu Y, Lu XM, Zurakowski D, Curley M, Collier S, Duggan C, Nurko S, Thompson J, Ajami A, Borgonha S, Young VR, Castillo L. Cysteine metabolism and whole blood glutathione synthesis in septic pediatric patients. *Crit Care Med.* 2001; 29:870-877.
9. Víctor VM, Espulgues JV, Hernández-Mijares A, Rocha M. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infect Disord Drug Targets.* 2009; 9:376-389.
10. Aebi H. Catalase. In *Methods in Enzymatic Analysis.* (H.U. Bergmeyer Ed.). New York: Ed. Academic Press 1974; 673-678.
11. Popovic-Dragonjic L, Jovanovic M, Vrbic M, Konstantinovic L, Kostic V, Dragonjic I. Antioxidant defense and oxidative stress in childrens with acute hepatitis A. *Ann Saudi Med.* 211; 31:258-262.
12. Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase derived prostanoids (F₂-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89:10721–10725
13. Morrow J, Hill K, Burk R, Nammour T, Badr K, Roberts J. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:9383-9387.
14. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142:231-255
15. Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med.* 1992; 20:724-726.
16. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med.* 2005; 6:2-8.
17. Watson RS, Carcillo JA. Scope and epidemiology of pediatric sepsis. *Pediatr Crit Care Med.* 2005; 6:S3-S5.
18. Brierley J, Carcillo JA, Choong K, Cornell T, Decaen A, Deymann A, Doctor A, Davis A, Duff J, Dugas MA, Duncan A, Evans B, Feldman J, Felmet K, Fisher G, Frankel L, Jeffries H, Greenwald B, Gutierrez J, Hall M, Han YY, Hanson J, Hazelzet J, Hernan L, Kiff J, Kissoon N, Kon A, Irazuzta J, Lin J, Lorts A, Mariscalco M, Mehta R, Nadel S, Nguyen T, Nicholson C, Peters M, Okhuysen-Cawley R, Poulton T, Relves M, Rodriguez A, Rozenfeld R, Schnitzler E, Shanley T, Kache S, Skippen P, Torres A, von Dessauer B, Weingarten J, Yeh T, Zaritsky A, Stojadinovic B, Zimmerman J, Zuckerberg A. Clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal septic shock: 2007 update from American College of Critical Care Medicine. *Crit Care Med.* 2009; 37:666-688.
19. Blackwell TS, Yull FE, Chen CL, Venkatakrishnan A, Blackwell TR, Hicks DJ, Lancaster LH, Christman JW, Kerr LD. Multiorgan nuclear factor kappa B activation in a transgenic mouse model of systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162:1095-1101.
20. Bone R, Grodzin C, Balk R. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 1997;112:235-243.
21. Balk R. Pathogenesis and management of multiple organ dysfunction or failure in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Clin.* 2000; 16:337-352.

22. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis.* 2000; 181:176-180.
23. Andrades M, Morina A, Spasic S, Spasojevic I. Bench-to-bedside review: sepsis from the redox point of view. *Crit Care.* 2011;15:230
24. Víctor VM, De la Fuente M. Several functions of immune cells in mice changed by oxidative stress caused by endotoxin. *Physiol Res.* 2003; 52:789-796.
25. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet.* 2006; 368:157-169.
26. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:197-216.
27. Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res.* 2003; 93:388-398.
28. Oldham KM, Bowen PE. Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial? *J Am Diet Assoc.* 1998; 98:1001-1008.
29. DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest.* 1998; 101:455-463.
30. Berger M, Chioléro. Antioxidant supplementation in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med.* 2007; 35:S584-590
31. Jung KA, Kwak MK: The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules.* 2010, 15:7266-7291.
32. Kong X, Thimmulappa R, Kombairaju P, Biswal S: NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species mediate amplified TLR4 signaling and sepsis-induced mortality in Nrf2-deficient mice. *J Immunol.* 2010, 185:569-577.
33. Deng Z, Pardi R, Cheadle W, Xiang X, Zhang S, Shah SV, Grizzle W, Miller D, Mountz J, Zhang HG: Plant homologue constitutive photomorphogenesis 9 (COP9) signalosome subunit CSN5 regulates innate immune responses in macrophages. *Blood.* 2011; 117:4796-4804.
34. Nam NH: Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. *Mini Rev Med Chem.* 2006; 6:945-951.
35. Virdis A, Colucci R, Fornai M, Blandizzi C, Duranti E, Pinto S, Bernardini N, Segnani C, Antonioli L, Taddei S, Salvetti A, Del Tacca M: Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: Role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Therapeut.* 2005; 312:945-953.
36. Arnalich F, Garcia-Palomero E, López J, Jiménez M, Madero R, Renart J, Vázquez JJ, Montiel C: Predictive value of nuclear factor kB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect Immun.* 2000; 68:1942-1945.
37. Böhrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jllmer T, Männel D, Böttiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martin E, Nawroth PP: Role of NF-kB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest.* 1997; 100:972-985.
38. Nicholson SC, Hahn RT, Grobmyer SR, Brause JE, Hafner A, Potter S, Devereux RB, Nathan CF: Echocardiographic and survival studies in mice undergoing endotoxic shock: effects of genetic ablation of inducible nitric oxide synthase and pharmacologic antagonism of platelet-activating factor. *J Surg Res.* 1999; 86:198-205.
39. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY: Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* 1995; 375:408-411.
40. Ergenekon E, Gücüyener K, Erbaş D, Koç E, Ozturk G, Atalay Y: Urinary nitric oxide in newborns with infections. *Biol Neonate.* 2000; 78:92-97.
41. Figueras-Aloy J, Gómez L, Rodríguez-Miguélez JM, Jordán Y, Salvia MD, Jiménez W, Carbonell-Estrany X: Plasma nitrite/nitrate and endothelin-1 concentrations in neonatal sepsis. *Acta Paediatr.* 2003; 92:582-587.
42. Marom D, Yuhas Y, Sirota L, Livni G, Ashkenazi S: Nitric oxide levels in preterm and term infants and in premature infants with bacteremia. *Biol Neonate.* 2004; 86:160-164.
43. Evans T, Carpenter A, Kinderman H, Cohen J: Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. *Circ Shock.* 1993; 41:77-81.
44. Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1504:46-57.
45. Angstwurm MWA, Schottdorf J, Schopohl J, Gaertner R: Selenium replacement in patients with severe systemic inflammatory response syndrome improves clinical outcome. *Crit Care Med.* 1999; 27:1807-1813.
46. Umbreit J: Methemoglobin - it's not just blue: a concise review. *Am J Hematol.* 2007, 82:134-144.

47. Sanodze N, Uberi N, Uberi E, Kulumbegov B: Parameters of oxidative metabolism in neonates suffering from sepsis and anemia. *Georgian Med News*. 2006; 140:65-67.
48. Davies NA, Cooper CE, Stidwell R, Singer M: Inhibition of mitochondrial respiration during early stage sepsis. *Adv Exp Med Biol*. 2003; 530:725-736.
49. Boulos M, Astiz ME, Barua RS, Osman M: Impaired mitochondrial function induced by serum from septic shock patients is attenuated by inhibition of nitric oxide synthase and poly (ADP-ribose) synthase. *Crit Care Med*. 2003; 31:353-358.
50. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42:153-164.
51. Cepinskas G, Wilson JX. Inflammatory response in microvascular endothelium in sepsis: role of oxidants. *J Clin Biochem Nutr*. 2008; 42:175-184.
52. Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 2004; 32:1825-1831.
53. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M; Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2001; 345:1368-1377.
54. Dare AJ, Phillips AR, Hickey AJ, Mittal A, Loveday B, Thompson N, Windsor JA. A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47:1517-1525.
55. Soriano FG, Nogueira AC, Caldini EG, Lins MH, Teixeira AC, Cappi SB, Lotufo PA, Bernik MM, Zsengeller Z, Chen M, Szabó C. Potential role of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of myocardial contractile dysfunction associated with human septic shock. *Crit Care Med*. 2006; 34:1073-1079.
56. Nathan AT, Singer M. The oxygen trail: tissue oxygenation. *Br Med Bull*. 1999; 55:96-108.
57. Murphy MP: How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009, 417:1-13.
58. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth*. 2003; 90:221-232.
59. Fink MP. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. *Crit Care*. 2002; 6:491-499.
60. Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167:570-579.
61. Crouser ED, Julian MW, Huff JE, Joshi MS, Bauer JA, Gadd ME, Wewers MD, Pfeiffer DR. Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia. *Crit Care Med*. 2004; 32:478-488.
62. Carré JE, Singer M. Cellular energetic metabolism in sepsis: the need for a systems approach. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1777:763-771.
63. Singer M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med*. 2007; 35(9 Suppl):S441-448
64. Poderoso JJ, Fernandez S, Carreras MC, Tchercanski D, Acevedo C, Rubio M, Peralta J, Boveris A. Liver oxygen uptake dependence and mitochondrial function in septic rats. *Circ Shock*. 1994; 44:175-182.
65. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*. 2002; 360:219-223.
66. Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press; 2007.
67. Hotchkiss RS, Karl IE: *The pathophysiology and treatment of sepsis*. *N Engl J Med*. 2003; 348:138-150.
68. Tsai K, Hsu T, Kong C, Lin K, Lu F. Is the endogenous peroxyl-radical scavenging capacity of plasma protective in systemic inflammatory disorders in humans? *Free Radic Biol Med*. 2000; 28:926-933.
69. Alonso de Vega JM, Díaz J, Serrano E, Carbonell LF. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*. 2002; 30:1782-1786.
70. Andresen M, Regueira T, Bruhn A, Perez D, Strobel P, Dougnac A, Marshall G, Leighton F. Lipoperoxidation and protein oxidative damage exhibit different kinetics during septic shock. *Mediators Inflamm*. 2008; 2008:168652.
71. Salvemini D, Cuzzocrea S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33:1173-1185.
72. Strand OA, Leone A, Giercksky KE, Kirkeboen KA. Nitric oxide indices in human septic shock. *Crit Care Med*. 2000; 28:2779-2785.

73. Durant R, Klouche K, Delbosc S, Morena M, Amigues L, Beraud JJ, Canaud B, Cristol JP. Superoxide anion overproduction in sepsis: effects of vitamin e and simvastatin. *Shock*. 2004; 22:34-39.
74. Weber SU, Lehmann LE, Schewe JC, Thiele JT, Schröder S, Book M, Hoeft A, Stüber F. Low serum alpha-tocopherol and selenium are associated with accelerated apoptosis in severe sepsis. *Biofactors*. 2008; 33:107-119.
75. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med*. 1995; 23:646-651.
76. Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, Hamaguchi M, Minoshita Y, Ogawa H. Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*. 2003; 31:1048-1052.
77. Galley HF, Davies MJ, Webster NR. Ascorbyl radical formation in patients with sepsis: effect of ascorbate loading. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20:139-143.
78. Carbonell LF, Nadal JA, Llanos MC, Hernández I, Nava E, Díaz J. Depletion of liver glutathione potentiates the oxidative stress and decreases nitric oxide synthesis in a rat endotoxin shock model. *Crit Care Med*. 2000; 28:2002-2006.
79. Forceville X, Vitoux D, Gauzit R, Combes A, Lahilaire P, Chappuis P. Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients. *Crit Care Med*. 1998; 26:1536-1544.
80. Ware L, Fessel J, May A, Jackson L. Plasma biomarkers of oxidant stress and development of organ failure in severe sepsis. *Shock*. 2011; 1:12-17.
81. Cowley HC, Bacon PJ, Goode HF, Webster NR, Jones JG, Menon DK. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit Care Med*. 1996; 24:1179-1183.
82. Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J, Suter PM. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med*. 1996; 24:392-397.
83. Ogilvie AC, Groeneveld AB, Straub JP, Thijs LG. Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock. *Intensive Care Med*. 1991; 17:40-44.
84. Doise JM, Aho LS, Quenot JP, Guillaud JC, Zeller M, Vergely C, Aube H, Blettery B, Rochette L. Plasma antioxidant status in septic critically ill patients: a decrease over time. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008; 22:203-209.
85. Boekstegers P, Weidenhöfer S, Kapsner T, Werdan K. Skeletal muscle partial pressure of oxygen in patients with sepsis. *Crit Care Med*. 1994; 22:640-650.
86. Crimi E, Liguori A, Condorelli M, Cioffi M, Astuto M, Bontempo P, Pignatola O, Vietri MT, Molinari AM, Sica V, Della Corte F, Napoli C. The beneficial effects of antioxidant supplementation in enteral feeding in critically ill patients: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Anesth Analg*. 2004; 99:857-863
87. Nathens AB, Neff MJ, Jurkovich GJ, Klotz P, Farver K, Ruzinski JT, Radella F, Garcia I, Maier RV. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. *Ann Surg*. 2002; 236:814-822.
88. Mishra V, Baines M, Peery S, McLaughlin P, Carson J, Wenstone R, Shenkin A. Effect of selenium supplementation on biochemical markers and outcome in critically ill patients. *Clin Nutr* 2007;26:41-50
89. Nemeth I, Boda D. Xanthine oxidase activity and blood glutathione redox ratio in infants and children with septic shock syndrome. *Intensive Care Med*. 2001; 27:216-221.
90. Argaman, Z.; Young, V. R.; Noviski, N.; Castillo-Rosas, L.; Lu, X. M.; Zurakowski, D.; Cooper, M.; Davison, C.; Tharakan, J. F.; Ajami, A.; Castillo, L. Arginine and nitric oxide metabolism in critically ill septic pediatric patients. *Crit. Care Med*. 2003; 31:591-597
91. Batra, S. Kumar, R.; Seema; Kapoor, A. K.; Ray, G. Alterations in antioxidant status during neonatal sepsis. *Ann. Trop. Paediatr*. 2000; 20:27-33
92. Kapoor K, Basu S, Das B, Bhatia B. Lipid peroxidation and antioxidants in neonatal septicemia. *J Trop Pediatr*. 2006; 5:372-375.
93. 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: 1638-52.
94. Le Gall JR, Klar J, Lemeshow S, et al. The logistic organ dysfunction system: a new way to assess organ dysfunction in the intensive care unit. ICU Scoring Group. *JAMA*. 1996; 276: 802-10.
95. Spasojevic I, Obradovic B, Spasic S. Bench-to-bedside review: Neonatal sepsis - redox processes in pathogenesis. *Crit Care*. 2012; 16:221.
96. Proulx F, Gauthier M, Nadeau D, Lacroix J, Farrell CA. Timing and predictors of death in pediatric patients with multiple organ system failure. *Crit Care Med*. 1994; 22: 1025-31.

97. Wilkinson JD, Pollack MM, Glass NL, Kanter RK, Katz RW, Steinhart CM. Mortality associated with multiple organ system failure and sepsis in pediatric intensive care unit. *J Pediatr.* 1987; 111: 324–28.
98. Brady AJ, Poole-wilson PA. Circulatory failure in septic shock. Nitric oxide: too much of a good thing? *Br Heart J.* 1993; 70:103-105.
99. Schuerholz T, Marx G. Management of sepsis. *Minerva Anesthesiol.* 2008; 74:181-195.
100. Parker MM, Shelhamer JH, Natanson C, Alling DW, Parrillo JE. Serial cardiovascular variables in survivors and non survivors of human septic shock: heart rate as an early predictor of prognosis. *Crit Care Med.* 1987; 15:923-929.
101. Munt B, Jue J, Gin K, Fenwick J, Tweeddale M. Diastolic filling in human severe sepsis: an echocardiographic study. *Crit Care Med.* 1998; 26:1829-1833.
102. Court O, Kumar A, Parrillo JE, Kumar A. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care.* 2002;6:500-508.
103. Aneja RK, Carcillo JA. Differences between adult and pediatric septic shock. *Miverva Anesthesiol.* 2011; 77:1-7.
104. Singhi SC, Jayashree M. Dysharmony of hormonal functions in critically ill. *Pediatr Crit Care Med.* 2009; 10:131-133.
105. Ceneviva G, Paschall JA, Maffei F, Carcillo JA. Hemodynamic Support in Fluid-refractory Pediatric Septic Shock. *Pediatrics* 1998; 102:e19.
106. Nadel S, Goldstein B, Williams MD, Dalton H, Peters M, Macias WL, Abd-Allah SA, Levy H, Angle R, Wang D, Sundin DP, Giroir B; REsearching severe Sepsis and Organ dysfunction in children: a gLobal perspective (RESOLVE) study group. Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial. *Lancet.* 2007; 369:836-843.
107. Bongers TN, Emonts M, de Maat MP, de Groot R, Lisman T, Hazelzet JA, Leebeek FW. Reduced AD-AMTS13 in children with severe meningococcal sepsis is associated with severity and outcome. *Thromb Haemost.* 2003; 103:1181-1187
108. Posfay-Barbe KM, Zerr DM, Pittet D: Infection control in paediatrics. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:19-31.
109. Tarnow-Mordi W, Isaacs D, Dutta S: Adjunctive immunologic interventions in neonatal sepsis. *Clin Perinatol.* 2010; 37:481-499.
110. Edmond K, Zaidi A: New approaches to preventing, diagnosing, and treating neonatal sepsis. *PLoS Med.* 2010; 7:e1000213.
111. Melvan JN, Bagby GJ, Welsh DA, Nelson S, Zhang P: Neonatal sepsis and neutrophil insufficiencies. *Int Rev Immunol* 2010, 29:315-348.
112. Cherian S, Jameson S, Rajajajeswari C, Helena V, Latha L, Anu Rekha MR, Nagamma T, Subba Raju V, Kini PG, Rao A. Oxidative stress in sepsis children. *Indian J Med Res.* 2007; 125:143-148.
113. Koch L, Fritzsching B, Frommhold D, Poeschl J: Lipopolysaccharide-induced expression of Th1/Th2 cytokines in whole neonatal cord and adult blood: role of nuclear factor-kappa B and p38 MAPK. *Neonatology.* 2011; 99:140-145.
114. Cao W, Li XQ, Zhang XN, Hou Y, Zeng AG, Xie YH, Wang SW: Madecassoside suppresses LPS-induced TNF-alpha production in cardiomyocytes through inhibition of ERK, p38, and NF-kappaB activity. *Int Immunopharmacol.* 2010; 10:723-729.
115. Peng T, Lu X, Feng Q: NADH oxidase signaling induces cyclooxygenase-2 expression during lipopolysaccharide stimulation in cardiomyocytes. *FASEB J.* 2005; 19:293-295.
116. Hickson-Bick DL, Jones C, Buja LM: The response of neonatal rat ventricular myocytes to lipopolysaccharide-induced stress. *Shock.* 2006; 25:546-552.
117. Jung HS, Yoon BH, Jun JK, Kim M, Kim YA, Kim CJ: Differential activation of mitogen activated protein kinases and nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-treated term and preterm amnion cells. *Virchows Arch.* 2005; 447:45-52.
118. Silveira RC, Procionoy RS: High plasma cytokine levels, white matter injury and neurodevelopment of high risk preterm infants: assessment at two years. *Early Hum Dev.* 2011; 87:433-437.
119. Leteurtre S, Duhamel A, Grandbastien B, Lacroix J, Leclerc F. Paediatric logistic organ dysfunction (PELOD) score. *Lancet.* 2006; 367:897; author reply 900-902.
120. Leteurtre S, Duhamel A, Grandbastien B, Proulx F, Cotting J, Gottesman R, Joffe A, Wagner B, Hubert P, Martinot A, Lacroix J, Leclerc F. Daily estimation of the severity of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill children. *CMAJ.* 2010; 182:1181-1187.
121. Leteurtre S, Martinot A, Duhamel A, Proulx F, Grandbastien B, Cotting J, Gottesman R, Joffe A, Pfenninger J, Hubert P, Lacroix J, Leclerc F. Validation of the paediatric logistic organ dysfunction (PELOD) score: prospective, observational, multicentre study. *Lancet.* 2003; 362:192-197.
122. Kanter RK. Post-intensive care unit pediatric hospital stay and estimated costs. *Crit Care Med.* 2000; 28: 220–23.

123. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239:70-76.
124. Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin Chem.* 1980; 26:227-231.
125. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976; 74:214-226.
126. Nebot C, Moutet M, Huet P, XU J Z, Yadan J C, and Chaudiere J. Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Anal Biochem.* 1993; 214: 442-451
127. Flohé L, Gunzler W A. Assays of glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology*, (S.P. Colowic and N.O. Kaplan Eds.). New York: Ed Academic Press. 1984; 105: 114-121.
128. Chuang C, Shiesh S, Chi C, Tu Y, Hor L, Shieh C, Chen M. Serum total antioxidant capacity reflects severity of illness in patients with severe sepsis. *Crit Care.* 2006; 10:R36
129. Il'yasova D, Morrow JD, Ivanova A, Wagenknecht LE: Epidemiological marker for oxidant status: comparison of the ELISA and the gas chromatography/ mass spectrometry assay for urine 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F2t-isoprostane. *Ann Epidemiol.* 2004; 14:793-797,
130. Watson R, Carcillo J, Linde-Zwirble W, Clermont G, Lidicker J, Angus D. The epidemiology of Severe Sepsis in Children in the United States. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167:695-701.
131. Awad J, Morrow J, Takahashi K, Robert J. Identification of Non-cyclooxygenase-derived Prostanoid (F2-Isoprostane) Metabolites in Human Urine and Plasma. *J Biol Chem.* 1993; 6:4161-4169.
132. Malmezat T, Breuillé D, Capitan P, Mirand PP, Obled C. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J Nutr.* 2000; 130(5):1239-46.
Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J Nutr.* 2000; 130:1239–1246
133. Nichol C, Herdman J, Sattar N, et al. Changes in the concentrations of plasma selenium and selenoproteins after minor elective surgery: further evidence for a negative acute phase response? *Clin Chem.* 1998; 44:1764–1766.

Anexos

Consentimiento informado

Certificado comité de ética de investigación en seres humanos, Universidad de Chile, Facultad de Medicina.

Certificado comité de bioética Hospital de niños Roberto del Río