

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



**PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA
EVOLUCIÓN CLÍNICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON
SEPSIS**

VÍCTOR MANUEL MOLINA CANCINO

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

Director Clínico de Tesis: Prof. Dra. Bettina von Dessauer G

Director Básico de Tesis: Prof. Dr. Ramón Rodrigo S

2014

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

**INFORME DE APROBACION TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas presentada por el candidato

VÍCTOR MANUEL MOLINA CANCINO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Ciencias Médicas en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 18 de diciembre de 2014.

Prof. Dr. Ramón Rodrigo S
Director Básico de Tesis
Laboratorio de Fisiopatología Renal
ICBM – Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dra. Bettina von Dessauer G
Director Clínico de Tesis
Unidad de Paciente Crítico
Hospital de niños Roberto del Río

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Pamela Romanque U.

Prof. Dra. Julia Guerrero P.

Prof. Dr. Carlos Acuña A.

Prof. Dr. Luis Videla C.
Presidente Comisión de Examen

Y es que las preguntas verdaderamente serias son aquellas que pueden ser formuladas hasta por un niño.

Sólo las preguntas más ingenuas son verdaderamente serias.

Son preguntas que no tienen respuesta.

Una pregunta que no tiene respuesta es una barrera que no puede atravesarse.

Dicho de otro modo: precisamente las preguntas que no tienen respuesta son las que determinan las posibilidades del ser humano, son las que trazan las fronteras de la existencia del hombre.

- Milan Kundera -

Dedicado a los niños

Agradecimientos

Mis agradecimientos sinceros,

A todos los que en su propia manera me estimularon y ayudaron a completar este camino.

A mis directores de tesis, Dr. Ramón Rodrigo y Dra. Bettina von Dessauer por haber confiado en mí desde un principio.

A mi comisión revisora, por sus constructivos aportes para el desarrollo de esta tesis.

A mis padres y hermanos, por estar presentes en cada paso, aún sin saberlo.

A Mariana, mi incansable compañera, por su comprensión y cariño.

A los amigos de siempre, esos que perduran pese a la distancia y el tiempo.

A Chicho y Charlie, por sus aportes en las interminables tardes de análisis y discusión.

A todo el equipo de la Unidad de Paciente Crítico y la Unidad de Medicina Transfusional del Hospital Roberto del Río, sin cuya cooperación no habría sido posible llevar a cabo este trabajo.

A todo el grupo de trabajo del laboratorio, especialmente a Rodrigo, Diego y Juan.
A Romina, por su desinteresado y comprometido apoyo.

A todos los niños y padres que me dieron su confianza.

Financiamiento

Esta tesis fue financiada mediante:

- Beca CONICYT para estudios de doctorado en Chile, adjudicada el año académico 2009

Índice general

	Página
Índice de figuras	7
Índice de tablas	9
Índice de anexos	10
Abreviaturas	11
Resumen	13
Abstract	15
1. Introducción	17
1.1. Relevancia del problema	17
1.2. Definiciones	17
1.3. Generalidades sobre especies reactivas y estrés oxidativo	18
1.4. Fisiopatología de la sepsis	20
1.5. Papel de los biomarcadores de estrés oxidativo en sepsis	26
2. Hipótesis	29
3. Objetivo general	29
4. Objetivos específicos	29
5. Metodología	30
5.1. Diseño del estudio	30
5.2. Desarrollo del estudio por objetivo específico	30
5.3. Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo	33
5.3.1. Procesamiento de las muestras	33
5.3.2. Mecanismos de defensa antioxidante no enzimática	33
5.3.3. Mecanismos de defensa antioxidante enzimática	34
5.3.4. Biomarcadores de daño oxidativo	35
5.3.5. Biomarcadores de actividad inflamatoria	35
5.4. Cálculo de tamaño muestral y análisis estadístico	37
5.4.1. Cálculo de tamaño muestral	37
5.4.2. Análisis estadístico	38

6. Resultados	39
6.1. Evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes sin patología infecciosa aguda	39
6.2. Biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con sepsis	43
6.2.1. Mecanismos de defensa antioxidante no enzimática	45
6.2.2. Mecanismos de defensa antioxidante enzimática	47
6.2.3. Biomarcadores de daño oxidativo	48
6.2.4. Actividad inflamatoria	49
6.3. Biomarcadores de estrés oxidativo según gravedad del cuadro clínico	50
6.3.1. Mecanismos de defensa antioxidante no enzimática	51
6.3.2. Mecanismos de defensa antioxidante enzimática	55
6.3.3. Biomarcadores de daño oxidativo	59
6.3.4. Actividad inflamatoria	63
6.4. Biomarcadores de estrés oxidativo según etiología bacteriana del cuadro	63
6.5. Evolución de biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con sepsis	64
6.6. Utilidad de los biomarcadores de estrés oxidativo como predictores de evolución clínica	64
7. Discusión	69
8. Conclusiones	82
9. Referencias	83

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Esquema simplificado de la participación del estrés oxidativo en la génesis de la disfunción de órganos secundaria a sepsis	25
Figura 2. Biomarcadores de estrés oxidativo en grupo de pacientes sin patología infecciosa aguda	42
Figura 3. Correlación de edad con valores de SOD y FRAP en grupo de pacientes sin patología infecciosa aguda	43
Figura 4. Diagrama de flujo de reclutamiento del grupo estudio de pacientes con sepsis	44
Figura 5. Mecanismos de defensa antioxidante no enzimática en pacientes con sepsis y controles	46
Figura 6. Componentes del índice tiólico en pacientes con sepsis y controles	46
Figura 7. Actividad de enzimas antioxidantes en pacientes con sepsis y controles.	47
Figura 8. Marcadores de daño oxidativo en pacientes sépticos y controles	48
Figura 9. Activación de NF- κ B en pacientes sépticos y controles	49
Figura 10. Mecanismos antioxidantes no enzimáticos según clasificación del cuadro clínico en sepsis no grave y sepsis grave	52
Figura 11. Mecanismos antioxidantes no enzimáticos según clasificación por probabilidad de morir de acuerdo a score PELOD	53
Figura 12. Mecanismos antioxidantes no enzimáticos según clasificación de acuerdo al número de drogas vasoactivas requeridas	54
Figura 13. Actividad enzimática antioxidante según gravedad de la evolución del cuadro clínico en sepsis no grave o sepsis grave	56
Figura 14. Actividad enzimática antioxidante según clasificación por probabilidad de morir de acuerdo a score PELOD	57
Figura 15. Actividad enzimática antioxidante según clasificación de acuerdo al número de DVA requeridas	58

Figura 16. Correlación entre actividad de SOD y estimadores continuos de gravedad clínica al día 1 de hospitalización en pacientes con sepsis grave	59
Figura 17. Daño oxidativo según gravedad de la evolución de cuadro clínico en sepsis y sepsis grave	60
Figura 18. Daño oxidativo según probabilidad de morir estimada por score PELOD	61
Figura 19. Daño oxidativo según clasificación de acuerdo al número de DVA requeridas.	62
Figura 20. Activación de NF- κ B en pacientes con sepsis no grave y sepsis grave	63
Figura 21. Comparación de biomarcadores de estrés oxidativo según infección por patógeno gram (-) o gram (+) al primer día de hospitalización en UPCP.	65
Figura 22. Comparación de biomarcadores de estrés oxidativo según positividad de hemocultivo al primer día de hospitalización en UPCP	66
Figura 23. Evolución de biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con sepsis hasta el día 5 de hospitalización en UPCP	67
Figura 24. Evolución de biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con sepsis no grave y sepsis grave hasta el día 5 de hospitalización en UPCP	68

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Descripción del grupo de pacientes sin patología infecciosa aguda	40
Tabla 2. Características demográficas y biomarcadores de estrés oxidativo en grupo de pacientes sin patología infecciosa aguda	41
Tabla 3. Características demográficas y clínicas de pacientes con sepsis y sujetos del grupo control	45
Tabla 4. Biomarcadores de estrés oxidativo en grupo control y pacientes con sepsis al primer y segundo día de hospitalización en UPCP	49
Tabla 5. Características clínicas de pacientes con sepsis no grave y sepsis grave	51

Índice de anexos

	Página
Anexo 1. Acta de aprobación de comité de ética	92
Anexo 2. Consentimiento informado – grupo control	94
Anexo 3. Consentimiento informado – grupo de pacientes con sepsis	95
Anexo 4. Planilla de seguimiento	97

Abreviaturas

·OH:	Radical hidroxilo
¹O₂:	Singlete de oxígeno
ANOVA:	Análisis de la varianza
APACHE II:	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II</i>
BHT:	Hidroxitolueno butilado
CAT:	Catalasa
DAMP:	Patrón molecular asociado a peligro
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DVA:	Drogas vasoactivas
FRAP:	<i>Ferric reducing ability of plasma</i>
GSH:	Glutación reducido
GSHPx:	Glutación peroxidasa
GSSG:	Glutación oxidado
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
IKK:	<i>IκB kinase</i>
IL:	Interleuquina
iNOS:	Óxido nítrico sintasa inducible
IRAK:	<i>IL-1 receptor-associated kinase</i>
LPS:	Lipopolisacárido
MYD88:	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NEMO:	NF-κB <i>essential modulator</i>
NF-κB:	Factor nuclear kappa B
NLR:	Receptor NOD (<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>) - like
NO·:	Óxido nítrico
NO₂·:	Dióxido de nitrógeno
O₂^{·-}:	Anión radical superóxido
ONOO⁻:	Anión peroxinitrito
PAMP:	Patrón molecular asociado a patógenos

PBS:	Tampón fosfato salino
PELOD:	<i>Pediatric logistic organ dysfunction</i>
RIP 1:	<i>Receptor interacting protein kinase 1</i>
RNA:	Ácido ribonucleico
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
SDOM:	Síndrome de disfunción orgánica múltiple
SIRS:	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SOD:	Superóxido dismutasa
TAD:	Dominios de activación de transcripción
TBARs:	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
TIR:	<i>Toll/IL-1 receptor</i>
TLR:	Receptores <i>toll-like</i>
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR:	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>
TRAF:	<i>TNF receptor associated factor</i>
UPCP:	Unidad de paciente crítico pediátrico
VMI:	Ventilación mecánica invasiva
XO:	Xantina oxidasa

Resumen

Antecedentes: La sepsis grave con síndrome de disfunción orgánica múltiple (SDOM) constituye una causa frecuente de morbilidad y gasto de recursos en unidades de paciente crítico pediátrico (UPCP). Existe abundante evidencia en población adulta que relaciona la ocurrencia de estrés oxidativo con la progresión clínica de la sepsis grave hacia SDOM. El presente trabajo tiene como finalidad establecer la influencia del estrés oxidativo en la evolución de la sepsis pediátrica.

Metodología: Estudio prospectivo observacional que incluyó un grupo control de pacientes programados para cirugía menor electiva y un grupo de pacientes pediátricos que ingresaron UPCP con diagnóstico de sepsis. Se evaluaron los mecanismos de defensa antioxidante no enzimática mediante la capacidad antioxidante plasmática total (FRAP) y el índice tiólico eritrocitario (glutación reducido/glutación oxidado; GSH/GSSG). Entre los mecanismos de defensa antioxidante enzimática eritrocitaria se evaluaron las actividades de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutación peroxidasa (GSHPx). El daño oxidativo de lípidos y proteínas se evaluó de acuerdo a las concentraciones plasmáticas de F₂-isoprostanos y carbonilos proteicos, respectivamente. La actividad inflamatoria se evaluó mediante la activación del factor nuclear kappa-B (NF-κB).

Resultados: En el grupo control ($n = 49$), la edad se correlacionó positivamente con la actividad de SOD y negativamente con los niveles de FRAP. Los pacientes con sepsis ($n = 42$), al día 1 y 2 de evolución presentaron mayores valores de FRAP ($p < 0,001$), actividad de GSHPx ($p < 0,01$) y niveles de F₂-isoprostanos en plasma ($p < 0,0001$), junto con menores valores de índice tiólico ($p < 0,0001$) y actividades de SOD ($p < 0,0001$) y CAT ($p < 0,001$). Los pacientes con sepsis grave presentaron menor actividad de CAT ($p < 0,05$) y mayor activación de NF-κB ($p < 0,01$). Los pacientes sépticos con probabilidad de morir más alta presentaron valores mayores de FRAP al día 2 ($p < 0,05$), menor actividad de CAT al día 1 y

día 2 ($p < 0,05$), además de mayores niveles de F_2 -isoprostanos al día 2 ($p < 0,05$). Adicionalmente, el requerimiento de un mayor número de drogas vasoactivas se asoció con un aumento de FRAP al día 1 ($p < 0,05$) y al día 2 ($p < 0,01$) de evolución. En el subgrupo de pacientes con sepsis grave se observó una correlación positiva entre la actividad de SOD al día 1 y la duración de hospitalización en UCP ($p < 0,05$), la duración total de hospitalización ($p < 0,01$), la duración del requerimiento de ventilación mecánica invasiva ($p < 0,001$) y la duración del requerimiento de apoyo vasoactivo ($p < 0,05$). Los pacientes con sepsis no presentaron variación temporal de los biomarcadores de estrés oxidativo entre los días 1 a 5 de hospitalización en UCP. Análisis multivariantes no lograron establecer una utilidad de los biomarcadores evaluados como predictores de evolución clínica.

Conclusiones: La sepsis pediátrica se asocia a un desbalance prooxidante-antioxidante que resulta en estrés oxidativo. Los pacientes con evoluciones más graves presentan una mayor activación del factor de transcripción NF- κ B, una disminución de la actividad antioxidante de CAT y un aumento de la capacidad antioxidante plasmática, pese a lo cual se observa una mayor lipoperoxidación. No fue posible definir biomarcadores de estrés oxidativo con valor predictor de evolución clínica. El comportamiento de los biomarcadores de estrés oxidativo en los cuadros graves de sepsis infantil aún debe ser explorado.

Abstract

Background: Severe sepsis with associated multiple organ dysfunction syndrome (MODS) is a frequent cause of morbidity and resource expenditure in pediatric intensive care units (PICUs). A large body of evidence in adult population relates the occurrence of oxidative stress with clinical progression of severe sepsis towards MODS. The objective of this work is to elucidate the influence of oxidative stress in pediatric sepsis evolution.

Methodology: This is a prospective observational study that includes a control group of patients admitted for elective minor surgery and a group of pediatric patients admitted to the PICU with the diagnosis of sepsis. Mechanisms of non-enzymatic antioxidant defense were evaluated according to plasma antioxidant capacity (FRAP) and erythrocyte thiol index (reduced glutathione/oxidized glutathione; GSH/GSSG). Among enzymatic antioxidant defense mechanisms, we assessed the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSHPx). Lipid and protein oxidative damage was measured by the plasmatic concentrations of F₂-isoprostanes and protein carbonyls, respectively. Inflammatory activity was evaluated according to nuclear factor kappa-B (NF-κB) activation.

Results: Within the control group (n = 49), age was positively correlated to SOD activity and negatively correlated to FRAP level. At day 1 and 2 of evolution, septic patients (n = 42) showed higher FRAP values (p < 0.001), enzymatic activity of GSHPx (p < 0.01) and F₂-isoprostanes plasmatic levels (p < 0.0001), along with lower thiol index (p < 0.0001), and lower enzymatic activities of SOD (p < 0.0001) and CAT (p < 0.001). Patients with severe sepsis had lower enzymatic activity of CAT (p < 0.05) and an increase in NF-κB activation. Septic patients with higher death probability had higher FRAP values at day 2 (p < 0.05), lower enzymatic activity of CAT at day 1 and 2 (p < 0.05), and an increase in F₂-isoprostanes plasmatic levels at day 2 (p < 0.05). Additionally, the requirement of more

vasoactive drugs was associated with higher FRAP values at day 1 ($p < 0.05$) and at day 2 ($p < 0.01$). Within the subgroup of severe sepsis patients, a positive correlation between SOD activity at day 1 and PICU length of stay ($p < 0.05$), hospital length of stay ($p < 0.01$), length of invasive mechanical ventilation requirement ($p < 0.001$) and length of vasoactive drug support ($p < 0.05$), was observed. No changes in time, until day 5 of PICU hospitalization, were observed in the assessed biomarkers in septic patients. Multivariate analyses failed to determine a clinical outcome prediction ability of the evaluated oxidative stress biomarkers.

Conclusions: Pediatric sepsis associates with a prooxidant – antioxidant imbalance, which results in oxidative stress. The patients having worse clinical outcomes show higher NF- κ B activation, lower CAT enzymatic activity and higher plasma antioxidant capacity, despite of which they show increased levels of lipid oxidative damage. No oxidative stress biomarkers having outcome prediction ability were identified. Oxidative stress biomarkers behavior in severe cases of pediatric sepsis needs to be further addressed.

1. Introducción.

1.1. Relevancia del problema

La sepsis grave con síndrome de disfunción orgánica múltiple (SDOM) es una de las principales causas de muerte en unidades de cuidado intensivo. Esta entidad causa más de 200.000 muertes por año en Estados Unidos, igualando el número de pacientes adultos que fallecen por infarto agudo de miocardio [1]. La sepsis es también una causa importante de morbilidad y mortalidad en la población pediátrica. A nivel mundial las patologías infecciosas se encuentran entre las causas más frecuentes de muerte en los menores de 5 años, especialmente en la población neonatal [2]. En Estados Unidos se ha estimado un total de 42.000 casos por año de sepsis grave, con una mortalidad asociada de 10% [3], mientras que en el Reino Unido se ha observado que las infecciones dan cuenta de más del 10% de las muertes en niños menores de 4 años, aproximadamente 1.000 niños por año son ingresados a unidades de paciente crítico pediátrico (UPCP) con diagnóstico de sepsis grave y hasta un 20% de éstos fallece [4]. Adicionalmente, la sepsis pediátrica constituye una causa importante de gasto de recursos en salud, considerándose en series norteamericanas un promedio de hospitalización de hasta 31 días y un costo asociado de US\$ 40.600 por cada caso de sepsis grave [3]. A la fecha, no hay estudios que estimen la magnitud de este problema en nuestro país, pero es esperable que su incidencia sea similar o mayor a la de países desarrollados, debido a factores epidemiológicos que inciden en una mayor frecuencia de enfermedades infecciosas en nuestro medio. En la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital de Niños Roberto del Río, aproximadamente un 20% de los ingresos anuales corresponden a este diagnóstico, constituyendo una causa frecuente de utilización de camas críticas y de recursos asignados a esta unidad (información estadística, Hospital Roberto del Río, datos no publicados).

1.2. Definiciones

Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS): Presencia de 2 o más de los

siguientes criterios, uno de los cuales debe ser temperatura anormal o recuento alterado de leucocitos [5]:

- Temperatura central $\geq 38,5$ °C o < 36 °C.
- Taquicardia o bradicardia (según rangos para edad).
- Frecuencia respiratoria elevada para la edad.
- Recuento de leucocitos aumentado o disminuido para la edad, o más de 10% de formas inmaduras.

Sepsis: SIRS en presencia de sospecha o comprobación de un foco infeccioso [5,6].

Sepsis grave: asociación con disfunción cardiovascular o con síndrome de distrés respiratorio agudo, o la presencia de disfunción de dos o más de otros sistemas (respiratorio, renal, neurológico, hematológico o hepático) [5].

Síndrome de disfunción orgánica múltiple: disfunción de al menos 2 sistemas incluyendo: respiratorio, cardiovascular, neurológico, hematológico, renal, hepático y gastrointestinal [5,7].

Shock séptico: en adultos consiste en hipotensión persistente a pesar de un adecuado aporte de volumen. En niños, la hipotensión es un evento tardío en su evolución y el shock séptico se caracteriza por taquicardia con signos de hipoperfusión, como pulsos periféricos débiles, compromiso de conciencia, llene capilar lento o anormalmente rápido, extremidades frías o “moteadas”, y oliguria [6,8].

1.3. Generalidades sobre especies reactivas y estrés oxidativo

Los radicales libres son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones desapareados, una condición que los hace altamente reactivos. En sistemas celulares la mayoría de estos compuestos derivan del oxígeno, el cual tiene una

estructura electrónica que permite la captación de electrones, dando lugar a especies de oxígeno parcialmente reducidas. Dado que no todas estas moléculas son estrictamente radicales libres (pero pueden participar en vías de generación de radicales), se prefiere el término especies reactivas de oxígeno (ROS) [9,10].

Las ROS incluyen el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el singlete de oxígeno (1O_2). Existen además radicales libres derivados del nitrógeno, llamados especies reactivas de nitrógeno (RNS). Éstas incluyen el óxido nítrico ($NO\cdot$), dióxido de nitrógeno ($NO_2\cdot$) y anión peroxinitrito ($ONOO^-$). El $NO\cdot$ tiene importantes propiedades vasodilatadoras y antiproliferativas, pero su reacción con $O_2^{\cdot-}$ da lugar a $ONOO^-$, que es altamente tóxico [11]. El $NO_2\cdot$ puede participar en reacciones de terminación con algunas biomoléculas, dando lugar a compuestos nitrados, como aquellos que contienen residuos de nitrotirosina. Existen variadas fuentes de ROS-RNS en las células de mamíferos, incluyendo la reacción de Fenton, la cadena transportadora de electrones mitocondrial y las actividades enzimáticas de xantina oxidasa (XO), NADPH oxidasa, óxido nítrico sintasa, y mieloperoxidasa. Algunas de estas fuentes pueden ser inducidas en condiciones fisiopatológicas [11].

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno pueden mediar daño celular mediante distintos mecanismos. La lipoperoxidación es un conocido fenómeno de daño celular mediado por ROS [9]. Este mecanismo de injuria incluye la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de fosfolípidos de membrana celular, lo que puede generar mayor daño dado la generación de aldehídos que difunden y dañan blancos intracelulares o extracelulares [12]. Las cadenas laterales de aminoácidos son susceptibles al daño oxidativo por la acción de ROS-RNS, un mecanismo que ha sido implicado en procesos de envejecimiento [13]. Las modificaciones oxidativas en el DNA pueden participar en la patogenia de diversas condiciones, como la carcinogénesis, a través de daño directo al DNA o modulación de factores de transcripción o enzimas involucradas en regulación de expresión génica [9]. Otros mecanismos incluyen inducción de disfunción mitocondrial y disminución de

biodisponibilidad de NO[•] [14].

Existen múltiples mecanismos de defensa antioxidante que tienen como función evitar el daño oxidativo por ROS-RNS. Las moléculas antioxidantes funcionan como neutralizadoras, disminuyendo la biodisponibilidad de las especies reactivas. Estas moléculas pueden ser endógenas o exógenas, incluyendo vitamina C, vitamina E, carotenoides, ácido úrico y bilirrubina [11]. El sistema de defensa antioxidante incluye también las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSHPx). Superóxido dismutasa transforma el O₂^{•-} en H₂O₂, el cual es un sustrato para GSHPx y CAT. Catalasa metaboliza el H₂O₂ a H₂O y O₂, mientras que GSHPx reduce el H₂O₂ e hidroperóxidos orgánicos al reaccionar con glutatión reducido (GSH).

Normalmente existe un balance entre la producción de ROS-RNS y las defensas antioxidantes. Este equilibrio puede alterarse por un aumento de la producción de especies reactivas o una disminución de las defensas antioxidantes. El desbalance prooxidante-antioxidante, a favor del primero, se conoce como estrés oxidativo [15]. A través de los mecanismos discutidos, el estrés oxidativo puede participar de los mecanismos patogénicos de variadas condiciones mórbidas.

1.4. Fisiopatología de la sepsis

La sepsis grave es considerada un fenómeno de respuesta inflamatoria descontrolada, con pérdida del balance homeostático entre inflamación sistémica y la respuesta anti-inflamatoria que la contrarresta [16]. El objetivo teórico de este balance es confinar la inflamación y respuesta inmune sólo a los tejidos afectados por el proceso infeccioso primario. De acuerdo a la teoría clásica, la sepsis grave ocurre cuando la respuesta inflamatoria sistémica lleva a daño secundario de parénquimas no afectados por la infección. En esta condición el proceso infeccioso sería sólo un desencadenante, considerándose incluso que en algunos casos este daño puede progresar luego de que la infección fue tratada. Este paradigma ha sido cuestionado en el último tiempo, estableciéndose que en fases

posteriores el daño de órganos podría estar más relacionado con fenómenos de inmunosupresión [17].

La invasión de un tejido por una bacteria es seguida normalmente por la activación de mecanismos de respuesta inmune innata a través del reconocimiento de *patrones moleculares asociados a patógenos* (PAMPs, según su denominación en inglés). Estos patrones son inespecíficos y estructuralmente conservados, incluyendo los presentes en componentes bacterianos clave, como lipopolisacárido (LPS) y peptidoglicanos. El reconocimiento de estos patrones ocurre mediante receptores presentes en células fagocíticas que incluyen receptores toll-like (toll-like receptors, TLRs) y receptores NOD-like (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, NLRs) [18]. Los TLRs son una familia de receptores presentes en distintos tipos celulares, como monocitos, macrófagos, linfocitos y células dendríticas. Distintos tipos de TLRs responden a distintos PAMPs. En el caso de bacterias gram negativas el LPS es un importante factor de virulencia y es reconocido por TLR-4, mientras que en bacterias gram positivas el peptidoglicano de pared celular es reconocido por TLR-2 [19]. La activación de un TLR lleva al reclutamiento de moléculas adaptadoras en su porción citoplasmática, desencadenando una cascada de señalización que lleva finalmente a la traslocación del factor nuclear kappa-B (NF-κB) al núcleo [20]. Además del reconocimiento de patrones moleculares exógenos, la destrucción de tejidos lleva a la liberación de moléculas endógenas (como fibrinógeno, *high mobility group box protein 1* [HMGB1], *heat-shock proteins*, RNA y elastasa de neutrófilos) que también pueden activar a receptores TLR, como TLR-2 y TLR-4 [21]. Estos patrones moleculares han sido llamados *patrones moleculares asociados a peligro* (DAMPs, según su denominación en inglés) y serían responsables de la respuesta inflamatoria que se observa clínicamente en múltiples enfermedades inflamatorias crónicas y SIRS de causa no infecciosa (como por ejemplo, en el politraumatismo o quemaduras graves). La activación de TLRs por DAMPs desencadena mecanismos de señalización de manera similar a PAMPs, determinando la activación de NF-κB [22].

En términos generales, NF- κ B corresponde a una familia de factores de transcripción formada por 5 distintas subunidades: p50, p52, p65, c-Rel y RelB. Estos factores ejercen sus funciones formando dímeros. Sólo RelB, c-Rel y p65 contienen dominios de activación de transcripción (*transcription activation domains*, TAD), por lo que p50 y p52 sólo funcionan como activadores de transcripción cuando forman dímeros con alguno de los otros factores nombrados [23]. Normalmente NF- κ B se encuentra inactivo principalmente en el citoplasma, a través de la acción de proteínas I κ B inhibitorias.

El reconocimiento de un PAMP por un TLR recluta moléculas adaptadoras citoplasmáticas que contienen dominios TIR (*Toll/IL-1 receptor*), como MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), TIRAP (*TIR-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR-containing adaptor inducing interferon- β*) y TRAM (*TIR-domain-containing adaptor molecule*). La vía canónica de activación incluye el reclutamiento por parte de MyD88 de miembros de la familia de kinasas IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*), con fosforilación de IRAK4 e IRAK1, las que subsecuentemente se disocian de MyD88 e interactúan con TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*). TRAF-6 media la interacción proteica a través de ubiquitinización en residuos de lisina, determinando la activación de TAK1 (*transforming growth factor- β -activated kinase-1*), la que a su vez, como efector final o mediante kinasas intermediarias, activa al complejo IKK (*I κ B kinase*). El complejo IKK está formado por dos componentes catalíticos, IKK α e IKK β , y un componente regulatorio llamado NEMO (NF- κ B essential modulator, también conocido como IKK γ). El complejo IKK activado fosforila a las proteínas I κ B en residuos específicos de serina que señalizan para su ubiquitinización y posterior degradación proteosomal, lo que libera a NF- κ B de su inhibición y le permite su traslocación al núcleo para actuar como factor de transcripción [24,25].

NF- κ B es un factor de transcripción íntimamente involucrado en el proceso inflamatorio. Luego de su traslocación al núcleo es capaz de unirse a secuencias de DNA y promover la transcripción de genes que codifican varias citoquinas pro-

inflamatorias como TNF- α e IL-1 β . La producción de TNF- α es rápidamente estimulada, el que a su vez también tiene la capacidad de inducir la activación de NF- κ B y potenciar la respuesta [23]. El mecanismo de potenciación de la respuesta mediante la producción de TNF- α se inicia con la unión a su receptor TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*), lo que lleva al reclutamiento de la proteína TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*), determinando la formación de un complejo que incluye TRADD, TRAF2, TRAF5 y RIP1 (*receptor interacting protein kinase 1*). RIP1 es poliubiquitinizado, lo que le permite reclutar a TAK1 y al complejo IKK mediante NEMO. El complejo IKK es entonces fosforilado por TAK1, resultando en su activación [26].

NF- κ B está además involucrado en la transcripción de genes relacionados con la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de células endoteliales, permitiendo la quimiotaxis de células inflamatorias. Este factor participa en la producción de enzimas involucradas en la generación de ROS, como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [23]. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno participan en variadas cascadas intracelulares de señalización. Entre sus múltiples roles dentro del proceso inflamatorio, cabe destacar que estas especies reactivas son capaces de estimular la activación de NF- κ B, potenciando aún más el proceso inflamatorio [27]. Varios de estos mediadores potencian mutuamente su producción, lo que lleva a la amplificación del estímulo inicial dado por la infección. La presencia de componentes bacterianos estimula además la activación del sistema del complemento, lo que promueve la quimiotaxis y la liberación de otras sustancias con actividad inflamatoria, como histamina. El resultado final es la generación de la llamada “tormenta de citoquinas”, con reclutamiento de células inflamatorias hacia los tejidos infectados, lo que produce los cambios tisulares identificados clínicamente como inflamación. El desencadenamiento posterior de mecanismos más específicos de presentación de antígenos lleva al establecimiento de mecanismos de respuesta inmune adquirida.

Los neutrófilos se encuentran entre las células inflamatorias más relevantes para

los mecanismos de respuesta inmune innata y adquirida. En respuesta a la producción de citoquinas y la expresión de moléculas de adhesión, entre otros, son reclutados al lugar de la infección. Los neutrófilos ejercen su función mediante la fagocitosis de patógenos y su destrucción posterior. Los mecanismos de destrucción involucran enzimas y ROS. Específicamente, la activación de neutrófilos en el proceso inflamatorio lleva a un incremento masivo de la producción de ROS mediante la activación de la enzima NADPH oxidasa, proceso que se ha denominado “estallido respiratorio”. De esta manera, la producción de especies reactivas se encuentra aumentada precozmente en el desarrollo de la sepsis. A su vez, las ROS están íntimamente involucradas en los procesos de regulación de función de neutrófilos y otras células inflamatorias [28].

El proceso inflamatorio es indispensable para el control de la infección en el tejido afectado. Sin embargo, este mismo proceso puede ser nocivo para otros tejidos. De esta manera, existe un balance entre mecanismos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios, encontrándose dentro de estos últimos la producción de citoquinas anti-inflamatorias, como IL-10, antagonistas del receptor de IL-1 y receptores solubles de TNF [29]. La pérdida de este equilibrio sería responsable de la progresión de la sepsis y del compromiso progresivo de órganos. De la misma manera, la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno es inherente al proceso inflamatorio. Un desbalance entre los mecanismos de producción de ROS-RNS y los mecanismos de defensa antioxidante sería uno de los principales mecanismos fisiopatológicos subyacentes al desarrollo de SDOM [30,31]. Una de las injurias tempranas es a la que está expuesto el endotelio vascular. Las células endoteliales poseen TLRs y son capaces de responder ante el estímulo de componentes bacterianos [32]. El daño inflamatorio y oxidativo de este tejido produce disfunción endotelial, con apoptosis de células endoteliales y alteración de la permeabilidad vascular [33]. Esta disfunción lleva a mayor reclutamiento de leucocitos y activación de mecanismos de coagulación, con trombosis a nivel de microcirculación, condicionando hipoxia y daño tisular [34]. El aumento de actividad de iNOS a nivel endotelial lleva además a hiperproducción de NO^{*}, lo que

condiciona la vasoplejía e hipotensión que se observa en casos más avanzados [35]. La disfunción miocárdica se observa tempranamente en este proceso, mediada por la acción de citoquinas, ROS, NO^{*}, la presencia de apoptosis y de disfunción mitocondrial, entre otros [36-38]. La disfunción miocárdica, la vasoplejía y la alteración de la microcirculación son alteraciones fisiopatológicas que contribuyen a la disfunción de órganos secundaria a hipoperfusión tisular difusa. La participación del estrés oxidativo en la fisiopatología de la disfunción de órganos secundaria a sepsis se esquematiza en la Figura 1.

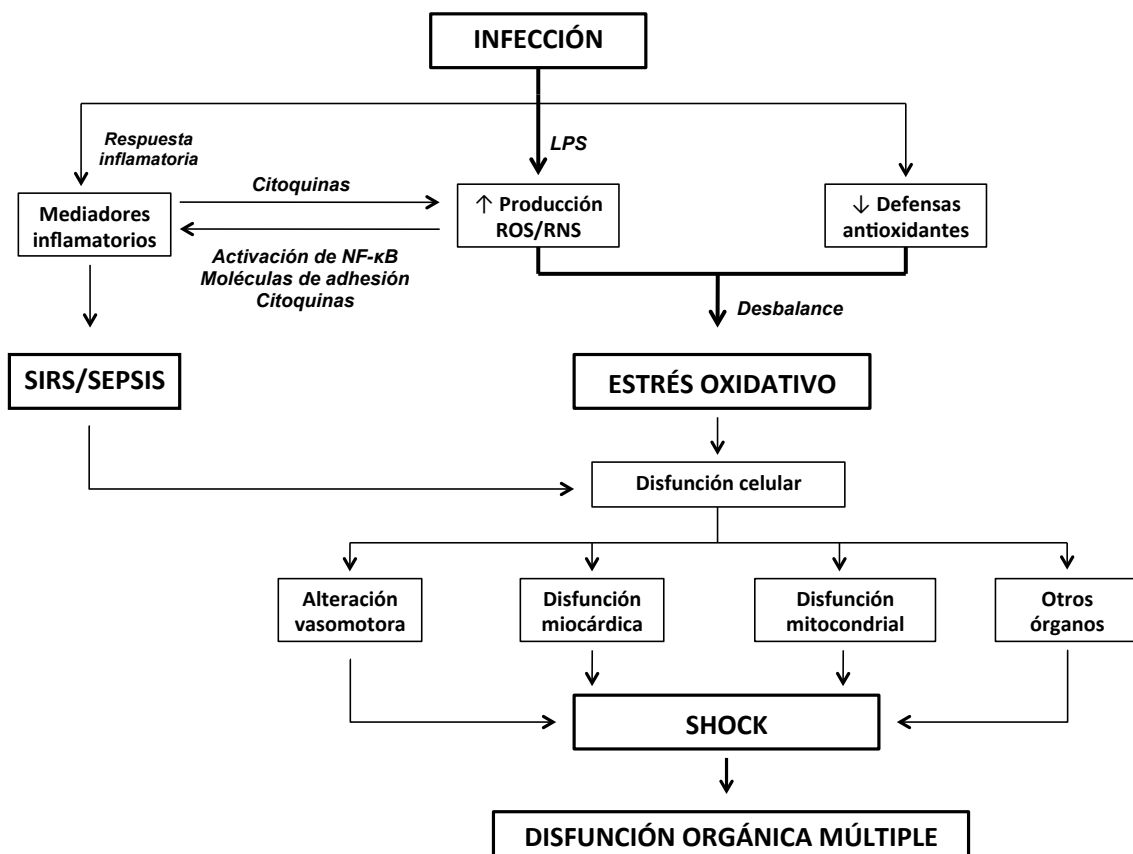


Fig. 1. Esquema simplificado de la participación del estrés oxidativo en la génesis de la disfunción de órganos secundaria a sepsis. *LPS*, lipopolisacárido; *ROS*, especies reactivas de oxígeno; *RNS* especies reactivas de nitrógeno. Modificado de ref. [39].

En el último tiempo, el paradigma de la hipoxia tisular como causa de la disfunción

de órganos ha sido cuestionado. Se ha planteado de forma complementaria que en algunos casos de sepsis y shock séptico la alteración sería más bien la incapacidad de utilizar en forma adecuada el oxígeno para la obtención de energía, lo que ha sido llamado “hipoxia citopática” [40]. En este caso, la alteración fisiopatológica sería la ocurrencia de disfunción mitocondrial. Existe abundante evidencia de que la disfunción mitocondrial durante la sepsis contribuiría a la progresión hacia SDOM a través de la producción de ROS-RNS, la activación de vías de apoptosis y la alteración bioenergética secundaria [41,42]. Más aún, la ocurrencia de estrés oxidativo a nivel mitocondrial promueve la disfunción de este organelo, estableciéndose un círculo vicioso entre disfunción mitocondrial y producción de ROS-RNS [43].

1.5. Papel de los biomarcadores de estrés oxidativo en sepsis

Se define un biomarcador como un indicador de eventos en sistemas biológicos o sus muestras [44]. Los biomarcadores pueden clasificarse en aquellos de efecto (indicador de un componente endógeno que se altera, reconociéndose como enfermedad), de susceptibilidad (indicador de que el sistema es especialmente sensible a una exposición en particular), o de exposición (indicador de la interacción entre una sustancia exógena y una endógena que da lugar a marcadores que no definen necesariamente alteración de función de tejidos). Además, los biomarcadores de efecto pueden clasificarse en tempranos y tardíos, dependiendo de la temporalidad de la disfunción de tejido que se está midiendo. Pueden existir alteraciones en biomarcadores que no estén directamente relacionadas con el proceso fisiopatológico pero que reflejen en forma sustituta la respuesta que está ocurriendo en el tejido objetivo [44]. De esta manera, la evidencia de biomarcadores en sepsis en general corresponde a biomarcadores de efecto en tejidos de órganos disfuncionantes o, más frecuentemente, en muestras de sangre u orina, que se considera reflejan un daño oxidativo en órganos blanco. La mayoría de los estudios realizados incluyen pacientes con sepsis o shock séptico ya establecidos, por lo que los biomarcadores de estrés oxidativo reflejarían disfunción y/o daño oxidativo en tejidos blanco, aunque

podrían también corresponder a un epifenómeno del proceso fisiopatológico. Sin embargo, dado la abundante evidencia del daño producido por modificaciones oxidativas de biomoléculas, es esperable que estos biomarcadores denoten procesos fisiopatológicos de progresión del cuadro en particular.

Existe abundante evidencia que confirma la ocurrencia de estrés oxidativo en pacientes con SIRS, como lo muestra la reducción de la capacidad neutralizante de radicales en plasma y de sus componentes (ácido úrico, grupos sulfhidrilo de proteínas, bilirrubina no conjugada, vitamina C, vitamina E y antioxidantes plasmáticos no identificados) [45,46]. Los pacientes con sepsis presentan niveles elevados de daño oxidativo de lípidos y proteínas [47,48]. Se ha reportado una concentración aumentada de nitrito y nitrato (productos de reacción de NO^{*}) en pacientes con shock séptico [49]. En concordancia, los pacientes con sepsis presentan niveles menores de glutatión reducido eritrocitario [47], alfa-tocoferol plasmático [50], selenio sérico [51], vitamina A sérica [52], beta-caroteno plasmático [47], licopeno plasmático [53] y ácido ascórbico plasmático [47].

Además de la ocurrencia de estrés oxidativo en el curso de la sepsis, aparentemente la magnitud de las modificaciones oxidativas se relaciona directamente con la gravedad de la evolución clínica. El potencial antioxidante plasmático en pacientes sépticos al comienzo de la enfermedad es menor que en sujetos sanos, para luego aumentar a valores normales o supra-normales en pacientes que sobreviven, a diferencia de los que fallecen [54]. Los productos de lipoperoxidación aumentan en pacientes sépticos que desarrollan SDOM, como lo demuestran los mayores niveles de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs) [47,55] y de F₂-isoprostanos [56]. Adicionalmente, valores aumentados de malondialdehído, otro marcador de lipoperoxidación, han sido reportados en sobrevivientes en relación a no sobrevivientes [57]. Modificaciones oxidativas de proteínas por RNS, medidas a través de la concentración de nitrotirosina, aparentemente también se relacionan con pronóstico en el shock séptico [58]. Por otra parte, se ha demostrado una activación de la enzima XO durante la sepsis,

apuntando a una alteración de microvasculatura que lleva a hipoperfusión e isquemia [59]. En concordancia, pacientes con menor actividad de XO muestran mejor sobrevida [59-61]. En adultos, se ha demostrado que la intensidad del daño oxidativo medido a través de la concentración urinaria de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, es mayor en pacientes que fallecen por sepsis, en relación a pacientes que sobreviven [62]. En este estudio, el score APACHE II al día 3 se correlacionó con mortalidad y con los niveles de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (el score APACHE II, *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*, corresponde a un sistema de estimación de gravedad en hospitalización en UCI, que integra distintas variables fisiológicas y predice mortalidad en adultos).

Como ya fue comentado, la activación de NF- κ B es un componente fundamental del proceso inflamatorio y está regulada por señales redox. Se ha demostrado una mayor activación de este factor de transcripción en pacientes con diagnóstico de SIRS (de origen infeccioso y no infeccioso) en relación a pacientes sanos [63]. Además, en pacientes adultos con sepsis se ha observado que la mayor actividad de NF- κ B se asocia a mayor letalidad del cuadro, correlacionándose con el score APACHE II [64,65].

En niños existe poca evidencia sobre la participación del estrés oxidativo en la patogénesis de la sepsis. Si bien la fisiopatología de la sepsis pediátrica comparte varios aspectos con la del adulto, algunas particularidades de la primera hacen que los estudios realizados en adultos no sean necesariamente extrapolables a la población infantil. Existe escasa evidencia que relacione la magnitud del daño oxidativo en la sepsis infantil con la gravedad clínica en estos pacientes. En un estudio que incluyó niños con diagnóstico de sepsis o SIRS posterior a cirugía o quemadura se demostraron mayores niveles de actividad de XO y del índice glutatión oxidado/reducido [66]. En contraste, en un estudio realizado en 38 pacientes pediátricos sépticos en India, no se encontraron diferencias en los niveles de GSH, SOD o TBARs, al compararlos con controles sanos [67]. La activación de NF- κ B en pacientes pediátricos sépticos ha sido evaluada mediante

citometría de flujo, encontrándose una mayor actividad de este factor de transcripción, incrementándose aún más en los cuadros de sepsis grave [68]. Una eventual asociación entre los niveles de estos biomarcadores y la gravedad de la evolución clínica podría permitir su uso como predictores de evolución, así como establecer las bases para una eventual estrategia terapéutica basada en refuerzo antioxidante [43].

2. Hipótesis

En pacientes pediátricos con sepsis, la gravedad de la evolución clínica se asocia positivamente con los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo y negativamente con los biomarcadores de defensas antioxidantes.

3. Objetivo general

Determinar la relación entre la evolución de la gravedad de la sepsis pediátrica y la ocurrencia de estrés oxidativo.

4. Objetivos específicos

- 1) Determinar los valores normales de biomarcadores de estrés oxidativo y defensas antioxidantes en una población de niños sin patología infecciosa.
- 2) Determinar los efectos de la sepsis pediátrica sobre los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo y defensas antioxidantes en pacientes críticos.
- 3) Establecer la relación de los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo y defensas antioxidantes con variables de gravedad clínica.
- 4) Identificar biomarcadores de estrés oxidativo con poder predictor de evolución clínica en pacientes pediátricos con sepsis.

5. Metodología

5.1. Diseño del estudio

Estudio prospectivo observacional, que incluyó un grupo de pacientes con diagnóstico de sepsis y un grupo de pacientes que no estaban cursando con un cuadro infeccioso agudo (grupo control). En ambos grupos se determinaron niveles de biomarcadores de estrés oxidativo en plasma y eritrocitos. El estudio se realizó en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Roberto del Río y contó con la aprobación del Comité de ética de investigación en seres humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y del Comité de ética del Servicio de Salud Metropolitano Norte (Anexo 1).

5.2. Desarrollo del estudio por objetivo específico

5.2.1. Objetivo específico 1: Determinar los valores normales de biomarcadores de estrés oxidativo y defensas antioxidantes en una población de niños sin patología infecciosa aguda.

Se reclutó un grupo de pacientes sin patología aguda, programados para cirugía electiva en el Hospital Roberto del Río. El consentimiento informado (anexo 2) se realizó al momento de la evaluación preanestésica. Se tomó una muestra de sangre luego de la anestesia inhalatoria, al momento de la instalación de la vía venosa. Si bien estos sujetos no son estrictamente sanos, no estaban cursando con patología infecciosa aguda o patología crónica sistémica evidenciable por anamnesis y examen físico. En este grupo se determinaron niveles de biomarcadores de defensas antioxidantes no enzimáticas y enzimáticas, daño oxidativo de lípidos y proteínas, y actividad inflamatoria.

5.2.2. Objetivo específico 2: Determinar los efectos de la sepsis pediátrica sobre los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo y defensas antioxidantes en pacientes críticos.

Se reclutó un grupo de pacientes que ingresaron a UPCP con diagnóstico de sepsis, según definiciones de consenso [5,6], cuyos padres aceptaron y firmaron el consentimiento informado respectivo (anexo 3). Se consideraron los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión:

- Edad mayor a 1 mes y menor a 7 años.
- Ingreso a UPCP.
- Diagnóstico de sepsis según definiciones de consenso internacional [5].

Criterios de exclusión:

- Portadores de patología oncológica o inmunológica.
- SIRS de causa no séptica (politraumatismo, gran quemado, cirugía mayor).
- Desnutrición.
- Uso de corticoides sistémicos por más de 2 semanas o suspendidos hace menos de 1 mes.
- Portadores de patología crónica (ej. insuficiencia renal crónica, daño hepático crónico, daño pulmonar crónico, patología neurodegenerativa, cardiopatía y otros).
- Tiempo de hospitalización mayor a 48 horas.

Los pacientes incluidos en el estudio fueron debidamente identificados en su ficha clínica. Se tomó una muestra diaria de sangre en los primeros 5 días de hospitalización en UPCP. En una hoja de seguimiento del protocolo, adjuntada en la ficha clínica, se consignaron los diagnósticos y las variables clínicas a analizar (Anexo 4). Se reclutó además un grupo control, pareado por edad y sexo, según metodología descrita en el punto anterior. En pacientes con sepsis y sujetos controles se determinaron biomarcadores de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos, daño oxidativo de lípidos y proteínas, y marcadores de actividad inflamatoria. Se compararon los niveles de estos biomarcadores entre ambos grupos de estudio.

5.2.3. Objetivo específico 3: Establecer la relación de los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo y defensas antioxidantes con variables de gravedad clínica.

Se estimó la gravedad clínica de los pacientes con diagnóstico de sepsis de acuerdo a la clasificación en cuadro de sepsis no grave o sepsis grave, según definiciones de consenso [5]. Se realizó una comparación de los niveles de biomarcadores de defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, daño oxidativo de lípidos y proteínas, y marcadores de actividad inflamatoria entre estos dos grupos. Dado que la muerte es un evento poco frecuente en la sepsis pediátrica se utilizó como outcome alternativo la probabilidad de morir estimada por el score PELOD, que cuantifica la gravedad de la disfunción orgánica múltiple y ha sido validado como predictor de mortalidad en sepsis [69-71]. Los pacientes se clasificaron de acuerdo a su probabilidad de morir < 1%, 1-10% y > 10%, para luego comparar los niveles de los biomarcadores referidos. Se realizó además una clasificación según el apoyo vasoactivo utilizado, en pacientes que requirieron 0-2 drogas vasoactivas (DVA) y 3 o más DVA. Además, se buscó una correlación entre los biomarcadores y la duración de hospitalización en UPCP, duración total de hospitalización, duración del requerimiento de ventilación mecánica invasiva (VMI) y duración del requerimiento de apoyo vasoactivo.

5.2.4. Objetivo específico 4: Identificar biomarcadores de estrés oxidativo con poder predictor de evolución clínica en pacientes pediátricos con sepsis.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los objetivos previos, mediante análisis multivariantes se buscó una asociación entre los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo y la clasificación del cuadro clínico en sepsis no grave y sepsis grave. Se buscó asociación con mortalidad estimada según score PELOD y se realizó un análisis de sobrevida en relación a duración de la estadía en UPCP, duración total de hospitalización, duración del requerimiento de VMI y duración del requerimiento de apoyo vasoactivo.

5.3. *Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo.*

5.3.1. Procesamiento de las muestras.

Las muestras de sangre se tomaron en tubos Vacutainer® con EDTA (K2-EDTA 1,8 mg/mL sangre). Mediante centrifugación se separó el plasma de los elementos figurados (2100 x g por 15 minutos). Los eritrocitos se lavaron 2 veces con solución fisiológica tras lo que se sometieron a hemólisis en medio hipotónico (agua destilada) en relación aproximada 1:4. Las muestras de plasma y hemolizado se almacenaron en alícuotas a -80° C hasta su utilización. Una alícuota de plasma se almacenó con hidroxitolueno butilado (BHT) 0,005% para la determinación de concentración de F₂-isoprostanos.

5.3.2. Mecanismos de defensa antioxidante no enzimática

Se determinó el nivel de FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) como medida de la capacidad antioxidante plasmática total. La cuantificación se realizó mediante técnica espectrofotométrica en muestra de plasma, de acuerdo a la reducción de Fe⁺³ a Fe⁺² en presencia de plasma y la reacción colorimétrica de Fe⁺² con tripiridiltriazina (lectura a 594 nm) [72]. La curva de calibración se realizó de acuerdo a concentración de Fe⁺² en forma de sulfato ferroso. Los niveles de FRAP incluyen el efecto antioxidante dado por el ácido úrico, por lo que se realizó una corrección de este valor. La concentración de ácido úrico se determinó mediante espectrofotometría de acuerdo a la producción de quinoneimina por las reacciones enzimáticas secuenciales de uricasa y peroxidasa en presencia de diclorohidroxibenceno sulfónico y 4-aminofenazona (lectura a 520 nm) [73]. Se determinó el valor de FRAP para distintas concentraciones de ácido úrico, a fin de corregir el valor original de FRAP.

Como medida de capacidad antioxidante intracelular se determinó en eritrocito la concentración de GSH y glutatión oxidado (GSSG), y la relación GSH/GSSG, llamada también índice tiólico. Esta medición se realizó mediante técnica de

fluorimetría, de acuerdo a la reacción de fluorescencia del orto-ftalaldehído (OPT) a pH 8 con GSH y a pH 12 con GSSG [74]. Inicialmente se centrifugaron 80 μ L de hemolizado (23.000 x g por 45 minutos) en presencia de ácido metafosfórico al 5% en solución buffer fosfato (K_2HPO_4 0,1 M; EDTA 5 mM; pH 8,0), a fin de inducir precipitación de proteínas. El sobrenadante se diluyó en solución buffer fosfato descrita y luego se midió la reacción de fluorescencia de GSH con OPT. La determinación de GSSG se realizó en solución NaOH 0,1 N (pH 12,0) de acuerdo a la reacción con OPT en presencia de N-etilmaleimida (a fin de prevenir la oxidación de GSH a GSSG). Las concentraciones se expresaron en relación a concentración de hemoglobina en la muestra inicial de hemolizado.

5.3.3. Mecanismos de defensa antioxidante enzimática

Se determinó la actividad de SOD, CAT y GSHPx en eritrocitos.

La actividad de SOD se midió mediante técnica de espectrofotometría, de acuerdo a la capacidad de SOD de inhibir la oxidación de epinefrina a adrenocromo mediada por $O_2^{\cdot -}$ [75]. El hemolizado se centrifugó a 23.000 x g por 5 minutos. Se hizo una dilución 1:10 del sobrenadante en solución KCl-Tris pH 7,40. En solución buffer glicina (glicina 50 mM, pH 10,2) se realizaron lecturas por 180 segundos a distintas concentraciones de plasma. Se evaluó la capacidad de inhibir la producción de adrenocromo (lectura a 480 nm) de acuerdo a la relación de las pendientes observadas. La actividad se expresó en relación a concentración de hemoglobina en la muestra original de hemolizado.

La actividad de CAT se cuantificó mediante técnica de espectrofotometría de acuerdo a la velocidad de descomposición (no espontánea) de H_2O_2 [76]. Se realizó una dilución del hemolizado en proporción 1:10 con tritón-etanol 10% en buffer fosfato (KH_2PO_4 20 mM; Na_2HPO_4 30 mM; pH 7,0). Se realizaron lecturas seriadas por 1 minuto, siguiendo el consumo de H_2O_2 (240 nm). Las lecturas se corrigieron de acuerdo a la descomposición de H_2O_2 en ausencia de muestra. La actividad enzimática se expresó en términos de constante cinética de primer orden

por gramo de hemoglobina.

La actividad de GSH-Px se cuantificó mediante técnica de espectrofotometría. La cuantificación utiliza como principio el consumo de NADPH por la reacción catalizada por la enzima glutatión reductasa, que a su vez utiliza también como sustrato el GSSG generado por la glutatión peroxidasa [77]. El hemolizado se centrifugó a $23.000 \times g$ por 5 minutos. Se hizo una dilución 1:5 del sobrenadante en solución fosfato de potasio (KH_2PO_4 0,1 M; EDTA 1 mM; pH 7,0). En la solución buffer descrita se realizaron lecturas seriadas por 5 minutos, analizando el consumo de NADPH (lectura a 340 nm) en presencia de GSH, azida de sodio (inhibidor de catalasa) y glutatión reductasa en exceso. La actividad enzimática se expresó en relación a la concentración de hemoglobina.

5.3.4. Biomarcadores de daño oxidativo

A fin de cuantificar el daño oxidativo de lípidos, se realizó medición de niveles plasmáticos de F_2 -isoprostanos mediante kit que utiliza técnica de ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Esta medición se basa en un ensayo de competencia entre F_2 -isoprostanos de la muestra y un conjugado entre F_2 -isoprostanos y acetilcolinesterasa, utilizando para la reacción colorimétrica un sustrato de acetilcolinesterasa. El resultado se expresó en concentración plasmática de F_2 -isoprostanos (pg/mL).

Se cuantificó el daño oxidativo de proteínas mediante la concentración plasmática de carbonilos proteicos. Para esto se utilizó un kit basado en fluorimetría (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI). Este kit utiliza el fluoróforo fluoresceína-5-tiosemicarbazida. El resultado se expresa en concentración de carbonilos en relación a proteínas plasmáticas totales.

5.3.5. Biomarcadores de actividad inflamatoria

Se midió la activación de NF- κ B en linfo-monocitos al día 2 de hospitalización en

UPCP.

Aislamiento de linfo-monocitos: Se tomó una muestra de 4 mL de sangre al 2º día de hospitalización. Se realizó una dilución con 2 mL de PBS (phosphate buffered saline) para luego situar estos 6 mL sobre 4 mL de Ficoll (1,077 g/mL) y luego centrifugar a 1.050 x g por 30 minutos. Se extrajo la capa de linfo-monocitos y se realizó un lavado con un volumen de PBS de 2 veces la capa extraída (aproximadamente 1,5 mL), para luego centrifugar a 1.050 x g por 15 minutos. El *pellet* de linfo-monocitos se resuspendió en 500 µL de PBS. El rendimiento de extracción alcanzado fue de 3,5 – 5 x 10⁶ células a partir de 4 mL de sangre.

Extracción de proteínas nucleares: Salvo que esté establecido explícitamente, las centrifugaciones descritas son a 17.000 x g por 10 segundos. Las células resuspendidas se centrifugaron para luego realizar un lavado con 500 µL de PBS y realizar una nueva centrifugación. El *pellet* se resuspendió en 200 µL de solución A (HEPES 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM; PMSF 0,2 mM; DTT 0,5 mM; pH 7,9) y se dejó incubar en hielo por 10 minutos. Se agregó Igepal® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a una concentración de 0,6%, para luego agitar en forma intensa y centrifugar. El *pellet* (nuclear) se resuspendió en 70 µL de solución C (HEPES 20 mM; glicerol 25%; NaCl 420 mM; MgCl 1,5 mM; EDTA 0,2 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,2 mM), agregando inhibidores de proteasas 100x en proporción 1:100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), dejando incubar en hielo por 20 minutos (agitando cada 5 minutos). A continuación se realizó una nueva centrifugación (17.000 x g por 2 minutos), almacenando el sobrenadante a -80 °C hasta su utilización. Se obtuvo una concentración final de proteínas nucleares de 0,8-2,3 µg/µL, a partir de los 4 mL iniciales de sangre.

Determinación de actividad de NF-κB: La determinación de NF-κB se realizó mediante kit que utiliza secuencias de unión de DNA específicas para NF-κB y anticuerpos contra subunidades p50 y p65. La cuantificación se realiza mediante espectrofotometría luego de técnica de ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

5.4. *Cálculo de tamaño muestral y análisis estadístico.*

5.4.1. Cálculo de tamaño muestral

Dado que el valor de F₂-isoprostanos constituye una medida directa del daño oxidativo en distintos blancos celulares, y que se ha descrito previamente un aumento de lipoperoxidación en pacientes sépticos, se utilizó esta medida como variable de interés primario. Además, dentro de los mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos, la actividad de SOD ha sido descrita como un marcador de gravedad en sepsis [78,79], por lo que también se consideró en el cálculo de tamaño muestral. Por último, también se incluyó como variable de interés primario el nivel de FRAP, por la importancia teórica de la capacidad antioxidante plasmática en el daño oxidativo durante la sepsis. Al momento del diseño experimental no existían estudios que hubieran evaluado en forma cuantitativa F₂-isoprostanos, actividad de SOD o FRAP en pacientes pediátricos con sepsis o en pacientes pediátricos críticos, por lo que no existían valores de referencia que permitieran calcular un tamaño muestral de manera adecuada. En consideración a esto, se utilizó la técnica de “muestreo por conveniencia”, reclutando en un estudio piloto un grupo control de 49 pacientes. Se consideró para las comparaciones con el grupo estudio un pareado de 1:1 por edad y género. Posteriormente se utilizaron los datos del grupo control y del grupo estudio para calcular en forma retrospectiva el tamaño muestral necesario para detectar diferencias entre estos dos grupos en relación a los biomarcadores descritos. Se calculó el tamaño muestral para lograr una potencia estadística de 80% y un error alfa de 0,05. Entre los tamaños muestrales calculados para las variables de interés primario se eligió el mayor, que resultó ser de 20 pacientes, en el caso de FRAP. El grupo estudio reclutado (n = 42) logra cumplir con los tamaños muestrales calculados para la mayoría de los biomarcadores estudiados, con la excepción de carbonilos proteicos (tamaño muestral necesario = 90) y actividad de GSH-Px (tamaño muestral necesario = 62).

5.4.2. Análisis estadístico

La distribución de los datos se evaluó mediante test de Shapiro-Wilk. De acuerdo a su distribución, los datos se describen en mediana-percentil o media-desviación estándar (DE). En el estudio piloto (n = 49) se compararon los valores de biomarcadores determinados en relación a género mediante prueba de t de Student en variables de distribución normal y prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon en variables que no cumplían con este tipo de distribución. Se evaluaron correlaciones de estos biomarcadores con la edad, a través del coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, según correspondiera de acuerdo a la distribución de las variables. Se comparó el grupo estudio de pacientes con sepsis y el grupo control con pruebas paramétricas y no paramétricas, de acuerdo a la distribución de las variables (prueba t de Student o Mann-Whitney-Wilcoxon, respectivamente), al momento del ingreso (día 1) y al segundo día (día 2) de hospitalización en UPCP. La comparación de los niveles de biomarcadores evaluados según la gravedad de la evolución (grupo control, sepsis y sepsis grave) y según mortalidad estimada por score PELOD se realizó mediante prueba de ANOVA con análisis *post-hoc* de Bonferroni o mediante prueba de Kruskal-Wallis, según la distribución de los datos. En las variables que no presentaban distribución normal se realizó una transformación por logaritmo natural de los datos, tras lo cual se comprobó la distribución normal de los nuevos valores. En los análisis según gravedad o tipo de infección que comprendían 2 grupos se utilizó prueba de t de student o Mann-Whitney-Wilcoxon, según correspondiera. Se evaluó una eventual correlación entre los niveles de los biomarcadores y variables continuas de estimación de gravedad (duración de hospitalización en UPCP, duración total de hospitalización, duración de requerimiento de VMI y duración del requerimiento de DVA) mediante coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, según correspondiera. Se buscó asociación entre los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo e indicadores dicotómicos de resultados (sepsis o sepsis grave) mediante modelos de regresión logística y con score PELOD mediante regresión ordinal. El análisis de sobrevida en relación a duración de la estadía en UPCP, duración total de hospitalización y días de requerimiento de VMI

se realizó mediante regresión de Cox. La evaluación de eventuales diferencias de los biomarcadores evaluados en relación a su evolución en el tiempo hasta el día 5 se realizó mediante prueba de ANOVA con análisis *post-hoc* de Bonferroni o prueba de Kruskal-Wallis. Para todos los análisis se consideró significativo un valor de $P < 0,05$. Se utilizó el software estadístico Stata (versión 11.2, StataCorp, College Station, Texas). Los gráficos de comparación de grupos se expresan en barras en el caso de variables paramétricas (promedio-desviación estándar) y, en el caso de variables no paramétricas, en diagrama de caja y bigotes (mediana, rango intercuartílico y p5-p95). Todos los gráficos se diseñaron en software GraphPad Prism versión 5.00 (GraphPad Software, San Diego California, USA).

6. Resultados

6.1. Evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes sin patología infecciosa aguda (objetivo específico 1)

Por limitaciones éticas, no fue posible estudiar a un grupo de sujetos sanos. Se reclutó un total de 49 sujetos, menores de 7 años, sin patología infecciosa aguda. Se obtuvieron valores de referencia de los biomarcadores explorados en esta población control. No se encontraron diferencias al clasificar según los principales grupos de patologías que motivaban la intervención quirúrgica (otorrinolaringológica, genitourinaria o cutánea). La descripción de los sujetos del grupo control se muestra en la Tabla 1. Los valores de los biomarcadores determinados en esta muestra se resumen en la Tabla 2. El análisis de estos datos no mostró diferencias significativas según género para ninguno de los biomarcadores estudiados (Figura 2). Se observó una correlación positiva de la edad de los sujetos con los valores de SOD, y una correlación negativa con los valores de FRAP (Figura 3). La edad no tuvo efecto sobre el resto de los biomarcadores.

Tabla 1: Descripción del grupo de pacientes sin patología infecciosa aguda

	Género	Edad (meses)	Diagnóstico	Intervención realizada
1	F	5	Cataratas congénitas	Instalación lente intraocular
2	F	5	Hernia inguinal	Hernioplastia
3	F	8	Hernia inguinal	Hernioplastia
4	F	14	Obstrucción de conducto lagrimal	Sondeo conducto lagrimal
5	F	16	Hernia umbilical	Hernioplastia
6	F	19	Hernia umbilical	Hernioplastia
7	F	21	Hernia umbilical	Hernioplastia
8	F	30	Amigdalitis crónica	Amigdalectomía
9	F	30	Tumor benigno cutáneo	Resección de pilomatrixoma
10	F	31	Hiperplasia adenoamigdalina	Adenoamigdalectomía
11	F	32	Roncopatía	Adenoamigdalectomía
12	F	32	Roncopatía	Adenoamigdalectomía
13	F	47	Roncopatía	Adenoamigdalectomía
14	F	48	Roncopatía	Adenoamigdalectomía
15	F	50	Roncopatía	Amigdalectomía
16	F	50	Hiperplasia adenoamigdalina	Adenoamigdalectomía
17	F	58	Papiloma preauricular	Resección de papiloma
18	F	58	Tumor benigno cutáneo	Resección de pilomatrixoma
19	F	62	Roncopatía	Amigdalectomía
20	F	66	Tumor benigno cutáneo	Resección de pilomatrixoma
21	F	74	Tumor benigno cutáneo	Resección de nevo
22	M	3	Hernia inguinal bilateral	Hernioplastia
23	M	6	Criptorquidia	Orquidopexia
24	M	7	Atrofia testicular	Orquidectomía
25	M	9	Hernia inguinal	Hernioplastia
26	M	10	Hidrocele no comunicante	Hidrocelectomía
27	M	11	Criptorquidia	Orquidopexia
28	M	13	Criptorquidia	Orquidopexia
29	M	17	Otitis media con efusión	Instalación de colleras en tímpano
30	M	18	Roncopatía	Adenoamigdalectomía
31	M	18	Hiperplasia adenoamigdalina	Adenoamigdalectomía
32	M	19	Criptorquidia	Orquidopexia
33	M	20	Fimosis	Circuncisión
34	M	22	Hernia inguinal	Hernioplastia
35	M	23	Otitis media con efusión	Instalación de colleras en tímpano
36	M	28	Hiperplasia adenoamigdalina	Adenoamigdalectomía
37	M	28	Hiperplasia adenoamigdalina	Adenoamigdalectomía
38	M	30	Fimosis	Circuncisión
39	M	34	Fimosis	Circuncisión
40	M	36	Fimosis	Circuncisión
41	M	40	Hiperplasia adenoamigdalina	Adenoamigdalectomía
42	M	49	Fimosis	Circuncisión
43	M	50	Fimosis	Circuncisión
44	M	50	Fimosis	Circuncisión
45	M	51	Hiperplasia adenoamigdalina	Adenoamigdalectomía
46	M	55	Fimosis	Circuncisión
47	M	59	Roncopatía	Amigdalectomía
48	M	65	Roncopatía	Amigdalectomía
49	M	73	Roncopatía	Adenoamigdalectomía

F, femenino; M, masculino

Tabla 2: Características demográficas y biomarcadores de estrés oxidativo en grupo de pacientes sin patología infecciosa aguda

Variable	
Sexo, n (%)	
Femenino	21 (43)
Masculino	28 (57)
Edad (meses) ^b	30,0 (16,5 – 50,0)
FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{L}$) ^b	148,4 (123,5 – 176,1)
GSH ($\mu\text{mol/g Hb}$) ^a	4,49 \pm 0,79
GSSG ($\mu\text{mol/g Hb}$) ^a	0,17 \pm 0,04
SOD (U/g Hb) ^a	213,9 \pm 35,8
Catalasa (k/g Hb) ^a	466,3 \pm 145,7
GSH-Px (U/g Hb) ^b	3,52 (2,98 – 4,65)
F ₂ -isoprostanos (pg/mL) ^a	8,42 \pm 4,30
Carbonilos proteicos (nmol/mg proteínas) ^b	0,30 (0,23 – 0,43)

Valores expresados en ^amedia (desviación estándar), ^bmediana (rango intercuartílico). *FRAP*, ferric reducing ability of plasma; *GSH*, glutatión reducido; *GSSG*, glutatión oxidado; *SOD*, superóxido dismutasa; *CAT*, catalasa; *GSHPx*, glutatión peroxidasa.

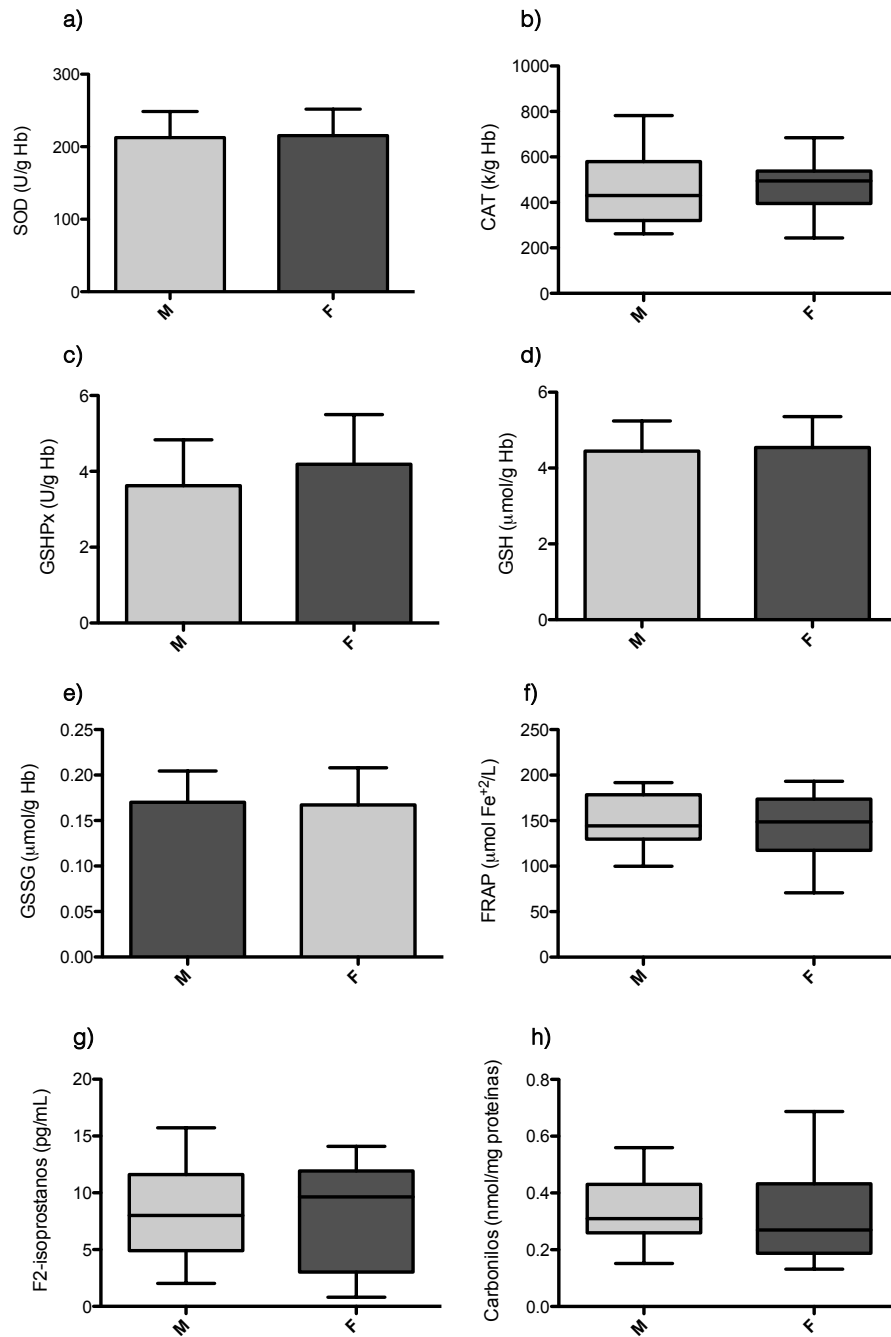


Fig. 2. Biomarcadores de estrés oxidativo en grupo sin patología infecciosa aguda, según sexo masculino (n = 28, barras gris claro) y femenino (n = 21, barras gris oscuro). No hay diferencias por género en ninguno de los biomarcadores evaluados. Barras, media + DE. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. M, masculino; F, Femenino. *FRAP*, ferric reducing ability of plasma; *GSH*, glutatión reducido; *GSSG*, glutatión oxidado; *SOD*, superóxido dismutasa; *CAT*, catalasa; *GSHPx*, glutatión peroxidasa.

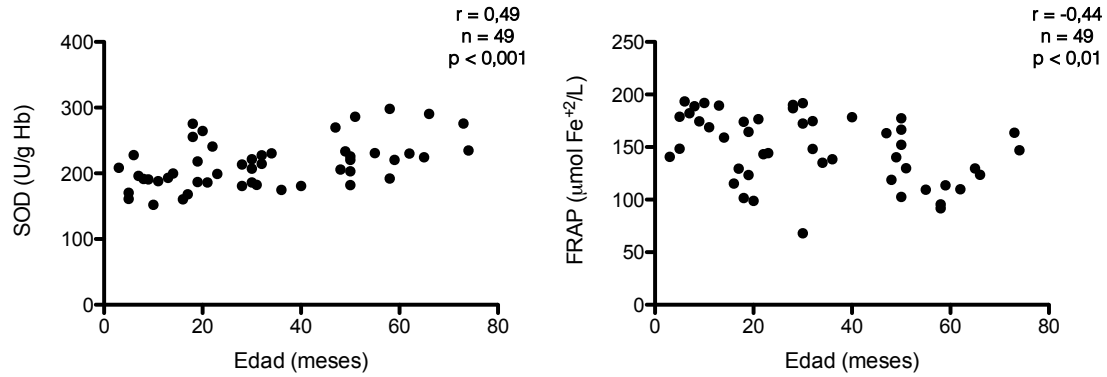


Fig. 3. Correlación de edad con valores de SOD y FRAP en grupo de pacientes sin patología infecciosa aguda. SOD, *superóxido dismutasa*; FRAP, *ferric reducing ability of plasma*.

6.2. Biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con sepsis (objetivo específico 2)

Se reclutaron un total de 42 pacientes con diagnóstico de sepsis al ingreso a UPCP. El diagrama de flujo del reclutamiento de los pacientes se muestra en la figura 4. En relación a cada paciente se reclutó un sujeto control pareado por edad y sexo, extraídos del grupo inicial de pacientes sin patología sistémica aguda o crónica. Las características demográficas y clínicas del grupo estudio y grupo control respectivo ($n = 42$) se muestran en la tabla 3. Las comparaciones de los biomarcadores evaluados se realizaron en la totalidad de pacientes sépticos y controles pareados, con la excepción de la concentración plasmática de carbonilos, que se determinó en la totalidad de los controles y sólo en 20 pacientes sépticos. Ya que no fue posible realizar en forma exacta el pareado por edad (en meses), se realizó una comparación entre ambos grupos, determinándose que la diferencia de edad observada no es estadísticamente significativa ($p = 0,3$).

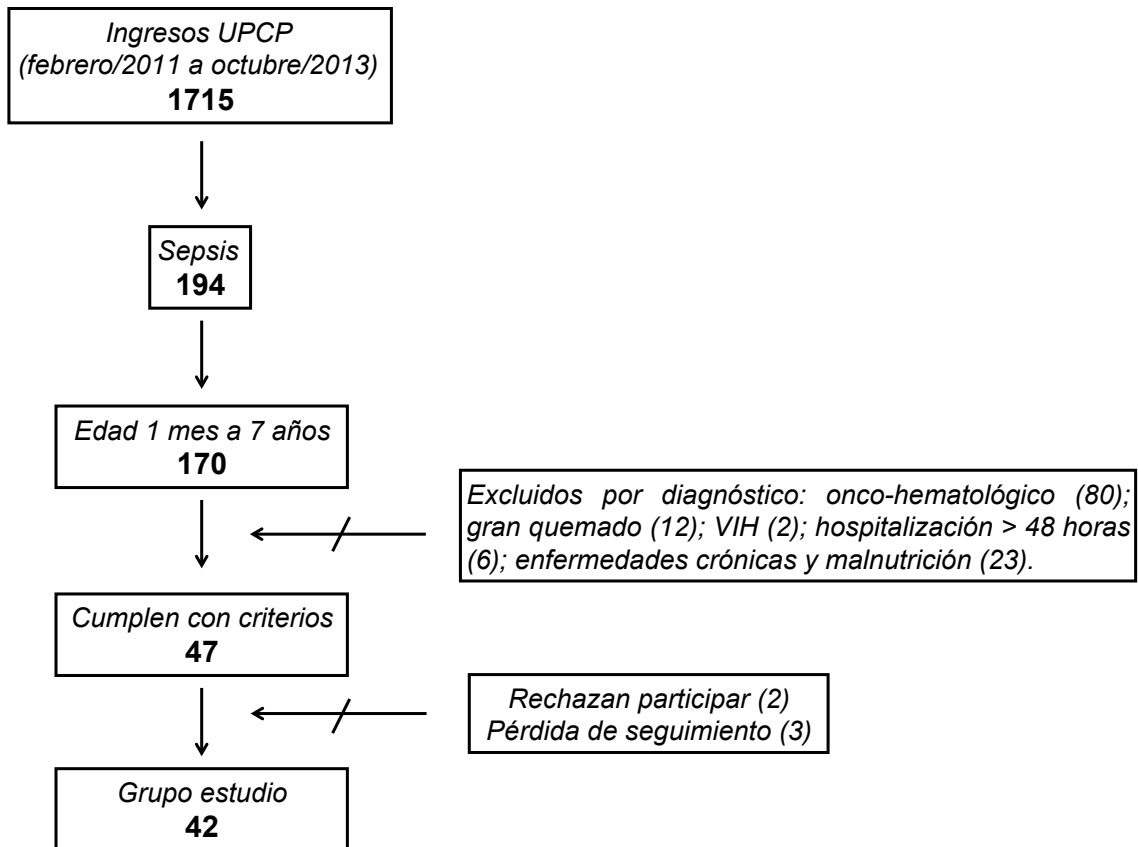


Fig. 4. Diagrama de flujo de reclutamiento del grupo estudio de pacientes con sepsis. UPCP, unidad de paciente crítico pediátrico.

Tabla 3: Características demográficas y clínicas de pacientes con sepsis y sujetos del grupo control

	Controles	Sepsis
Número	42	42
Edad (meses) ^a	25,5 (13,8 – 47,5)	21,0 (9,8 – 43,0) ^{ns}
Género, n (%)		
Masculino	24 (57)	24 (57)
Femenino	18 (43)	18 (43)
Score PELOD ^a		1,5 (1,0 – 13,0)
Mortalidad (%)		4,80%
Duración estadía en UPCP (días) ^a		3,0 (1,9 – 7,0)
Sitio de infección, n (%)		
Pulmonar		12 (28,5)
Cutáneo		8 (19,0)
Bacteriemia		7 (16,7)
Abdominal		6 (14,3)
SNC		5 (11,9)
Urinario		4 (9,5)
Confirmación microbiológica, n (%)		
Bacterias gram positivas		12 (28,6)
Bacterias gram negativas		9 (21,4)
Polibacteriano		2 (4,8)
Hongos		0
Virus		0
Positividad de hemocultivo, n (%)		12 (28,6)

^aValores expresados en mediana (rango intercuartílico). ^{ns}No significativo. *PELOD*, *pediatric logistic organ dysfunction*; *UPCP*, *unidad de paciente crítico pediátrico*.

6.2.1. Mecanismos de defensa antioxidante no enzimática

Se observó un mayor valor de FRAP en los pacientes sépticos al primer y segundo día de hospitalización en UPCP (Figura 5-a). En contraste, se observó un menor valor de índice tiólico en los pacientes con sepsis en ambos días (Figura 5-b). La exploración de los componentes del índice tiólico en ambos días mostró tanto un menor nivel de GSH como un mayor nivel de GSSG en pacientes sépticos (Figura

6). Los valores de los biomarcadores y la significancia estadística de las diferencias observadas se resumen en la Tabla 4.

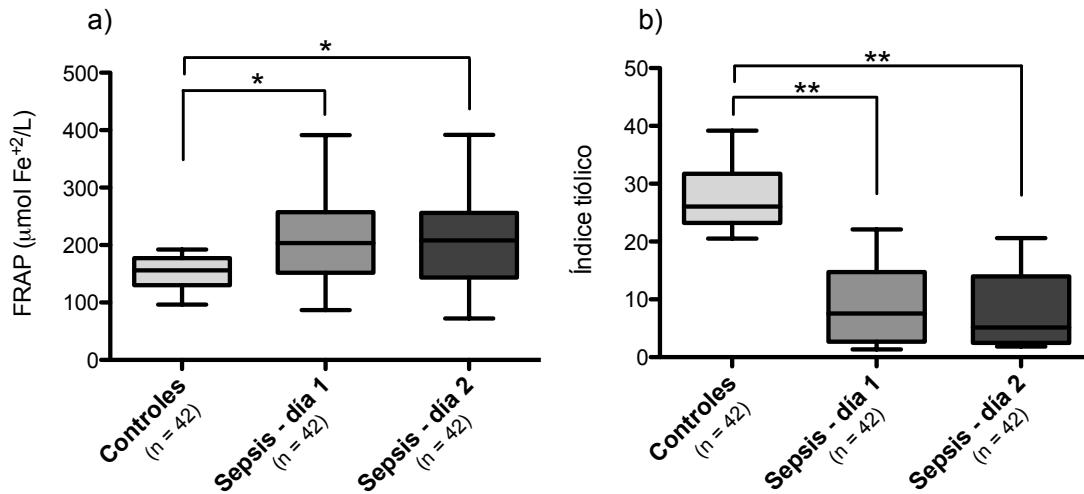


Fig. 5. Mecanismos de defensa antioxidante no enzimática en pacientes con sepsis y controles. a) FRAP; b) índice tiólico. * $p < 0,001$, ** $p < 0,0001$. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. *FRAP*, ferric reducing ability of plasma.

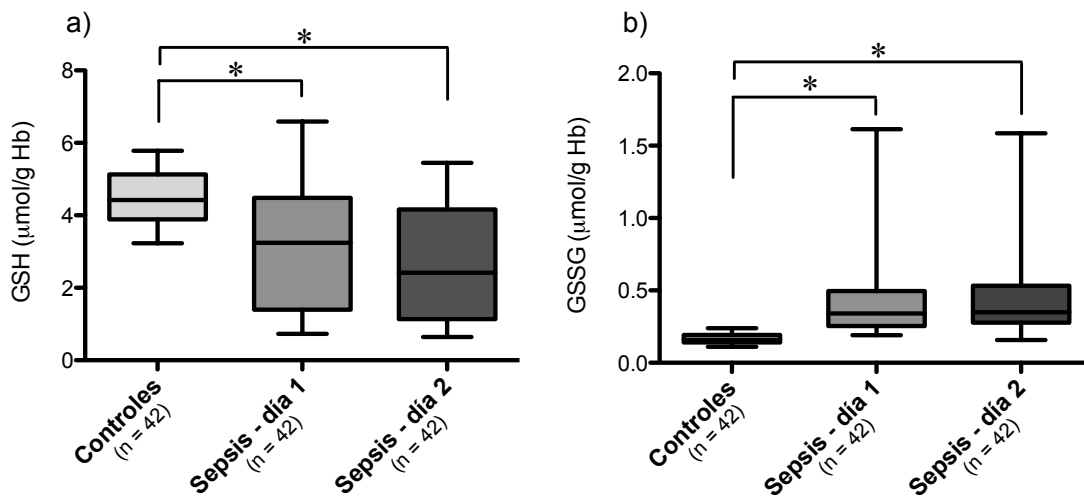


Fig. 6. Componentes del índice tiólico en pacientes con sepsis y controles. a) GSH; b) GSSG. * $p < 0,0001$. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. *GSH*, glutatión reducido; *GSSG*, glutatión oxidado.

6.2.2. Mecanismos de actividad antioxidante enzimática

En pacientes sépticos se observó una menor actividad de SOD y de CAT, respecto de los controles, en ambos días evaluados (Figuras 7-a y 7-b). En contraste, la actividad de GSHPx fue mayor en estos pacientes (Figura 7-c). Los valores de actividad enzimática obtenidos y la significación estadística de las diferencias observadas se resumen en la Tabla 4.

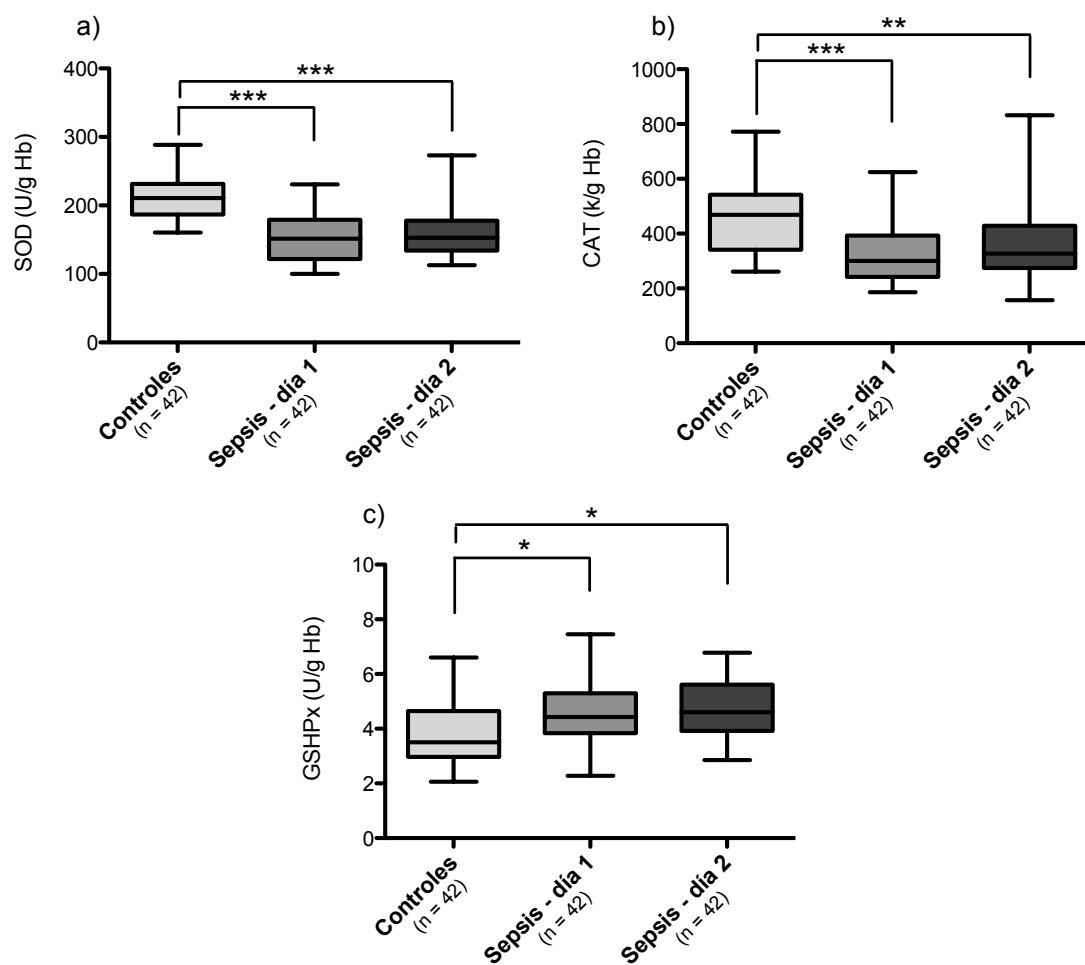


Fig. 7. Actividad de enzimas antioxidantes en pacientes con sepsis y controles. a) SOD; b) CAT; c) GSHPx. *p < 0,01; **p < 0,001; ***p < 0,0001. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. SOD, *superóxido dismutasa*; CAT, *catalasa*; GSHPx, *glutación peroxidasa*.

6.2.3. Biomarcadores de daño oxidativo

La evaluación de lipoperoxidación mostró mayores niveles plasmáticos de F₂-isoprostanos en pacientes con sepsis en ambos días evaluados (Figura 8-a). En el caso del daño oxidativo a proteínas, no se observaron diferencias en la concentración plasmática de carbonilos proteicos entre controles y pacientes sépticos en ambos días evaluados (Figura 8-b). Los valores observados de estos marcadores de daño oxidativo y la significación estadística de estas diferencias se resumen en la Tabla 4.

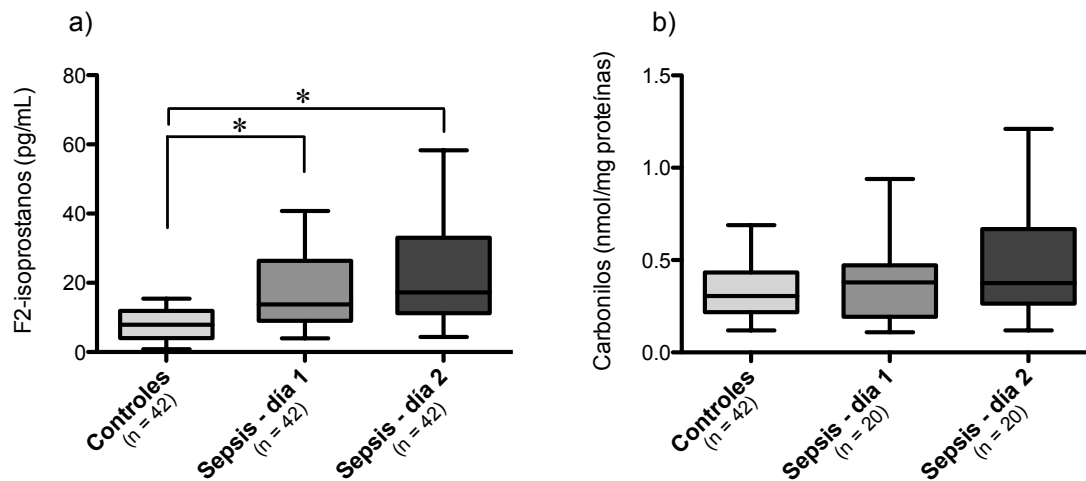


Fig. 8. Marcadores de daño oxidativo en pacientes sépticos y controles. a) F₂-isoprostanos en plasma; b) carbonilos proteicos en plasma. *p < 0,0001. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95.

Tabla 4: Biomarcadores de estrés oxidativo en grupo control y pacientes con sepsis al primer y segundo día de hospitalización en UPCP

Variable	Controles	Sepsis - día 1	Sepsis - día 2
FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{L}$)	155,7 (129,7 – 177,1)	210,3 \pm 82,1 **	213,0 \pm 90,5**
Índice tiólico	27,60 \pm 5,83	7,56 (2,67 – 14,75)***	5,16 (2,47 – 13,98)***
SOD (U/g Hb)	213,8 \pm 36,1	153,2 \pm 41,6***	153,0 (134,1 – 178,0)***
CAT (k/g Hb)	464,9 \pm 147,5	300,1 (242,3 – 392,6)***	327,1 (274,7 – 428,4)**
GSHPx (U/g Hb)	3,50 (2,97 – 4,64)	4,59 \pm 1,28*	4,65 \pm 1,22*
F ₂ -isoprostanos (pg/mL)	8,17 \pm 4,52	13,75 (9,05 – 26,40)***	17,20 (11,23 – 33,00)***
Carbonilos proteicos (nmol/mg proteínas)	0,31 (0,22 – 0,43)	0,38 (0,19 – 0,47) ^{ns}	0,38 (0,27 – 0,67) ^{ns}

Valores expresados en media \pm desviación estándar o en mediana (rango intercuartílico). *p < 0,01; ** p < 0,001; *** p < 0,0001; ^{ns}no significativo, al ser comparado con grupo control. *UPCP*, Unidad de Paciente Crítico Pediátrico; *FRAP*, ferric reducing ability of plasma; *SOD*, superóxido dismutasa; *CAT*, catalasa; *GSHPx*, glutatión peroxidasa.

6.2.4. Actividad inflamatoria

La evaluación de la activación de NF- κ B para las subunidades p50 y p65 no mostró diferencias entre el grupo control y el grupo de pacientes con sepsis (Figura 9).

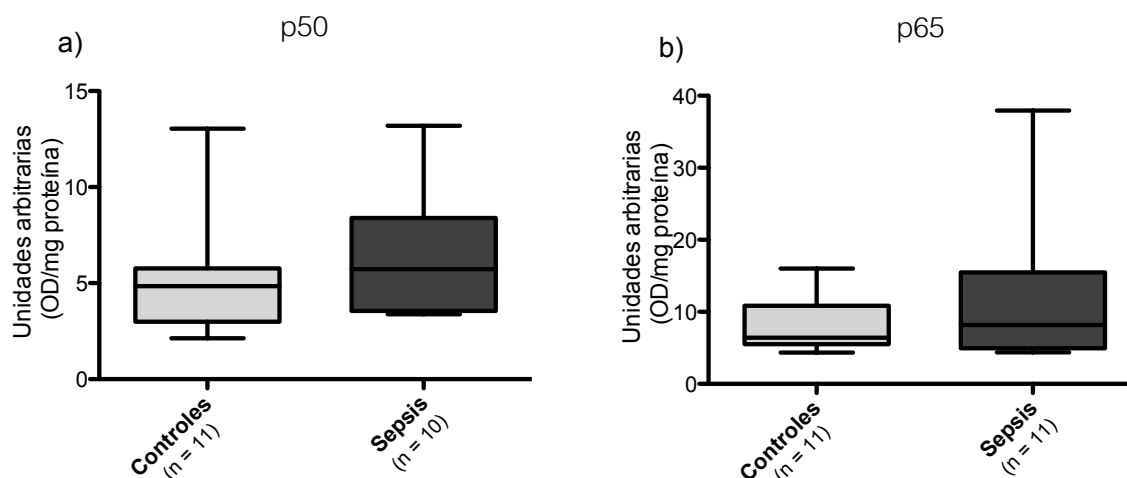


Fig. 9. Activación de NF- κ B en pacientes sépticos y controles. a) p50; b) p65. No se observan diferencias significativas. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95.

6.3. Biomarcadores de estrés oxidativo según gravedad del cuadro clínico (objetivo específico 3)

Se evaluó la presencia de cambios en biomarcadores de estrés oxidativo de acuerdo a la gravedad del cuadro clínico. La gravedad se estimó de acuerdo a los siguientes criterios:

- a) Clasificación del cuadro según diagnóstico de *sepsis no grave* o *sepsis grave*. Las características clínicas de estos dos grupos se presentan en la Tabla 5.
- b) Probabilidad de fallecer según estimación por score de PELOD. Se clasificó a los pacientes en probabilidad de muerte < 1%, 1-10% y > 10%.
- c) Uso de 2 o menos (0 a 2) DVA o uso de 3 o más DVA.
- d) Estimadores continuos de gravedad de evolución. Se evaluaron los biomarcadores en relación a duración de hospitalización en UPCP, duración total de hospitalización, duración de requerimiento de VMI y duración de requerimiento de apoyo vasoactivo. Se analizó también el tiempo de evolución del cuadro previo al ingreso a UPCP.

Tabla 5: Características clínicas de pacientes con sepsis no grave y sepsis grave

	Sepsis no grave	Sepsis grave
Número	21	21
Edad, meses ^a	22,0 (11,5 – 52,5)	20 (5,5 – 30,0) ^{ns}
Género, n (%)		
Masculino	14 (67)	10 (48)
Femenino	7 (33)	11 (52)
Score PELOD ^a	1 (0 – 1)	13 (11 – 21)*
Mortalidad, <i>n</i>	0	2
Duración estadía en UPCP ^a	2,0 (1,5 – 3,5)	5,5 (3,0 – 9,5)*
Duración total hospitalización (días) ^a	10,0 (8,0 – 13,0)	15,0 (10,0 – 28,0)*
Duración requerimiento de VMI (horas) ^a	0,0 (0,0 – 0,0)	90,0 (37,5 – 163,5)*
Confirmación microbiológica, n (%)		
Bacterias gram positivas	4 (19,0)	8 (38,1)
Bacterias gram negativas	5 (23,8)	4 (19,0)
Polibacteriano	1 (4,8)	1 (4,8)
Hongos	0	0
Virus	0	0
Positividad de hemocultivo, n (%)	4 (19,0)	8 (38,1)

^aValores expresados en mediana (rango intercuartílico). ^{ns}No significativo; **p* < 0,05. PELOD, *pediatric logistic organ dysfunction*; UPCP, *unidad de paciente crítico pediátrico*; VMI, *ventilación mecánica invasiva*.

6.3.1. Mecanismos de defensa antioxidante no enzimática

Se observó que los pacientes con sepsis no grave y sepsis grave al día 1 presentan mayores niveles de FRAP que los sujetos sanos. En el día 2 sólo los pacientes con sepsis grave muestran mayores niveles de FRAP en relación a controles. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los dos grupos de pacientes sépticos clasificados de esta manera (Figura 10-a y 10-b). El índice tiólico no mostró diferencias según la gravedad de la sepsis, observándose valores más bajos en ambos grupos de pacientes en relación a controles, en los dos días evaluados (Figura 10-c y 10-d).

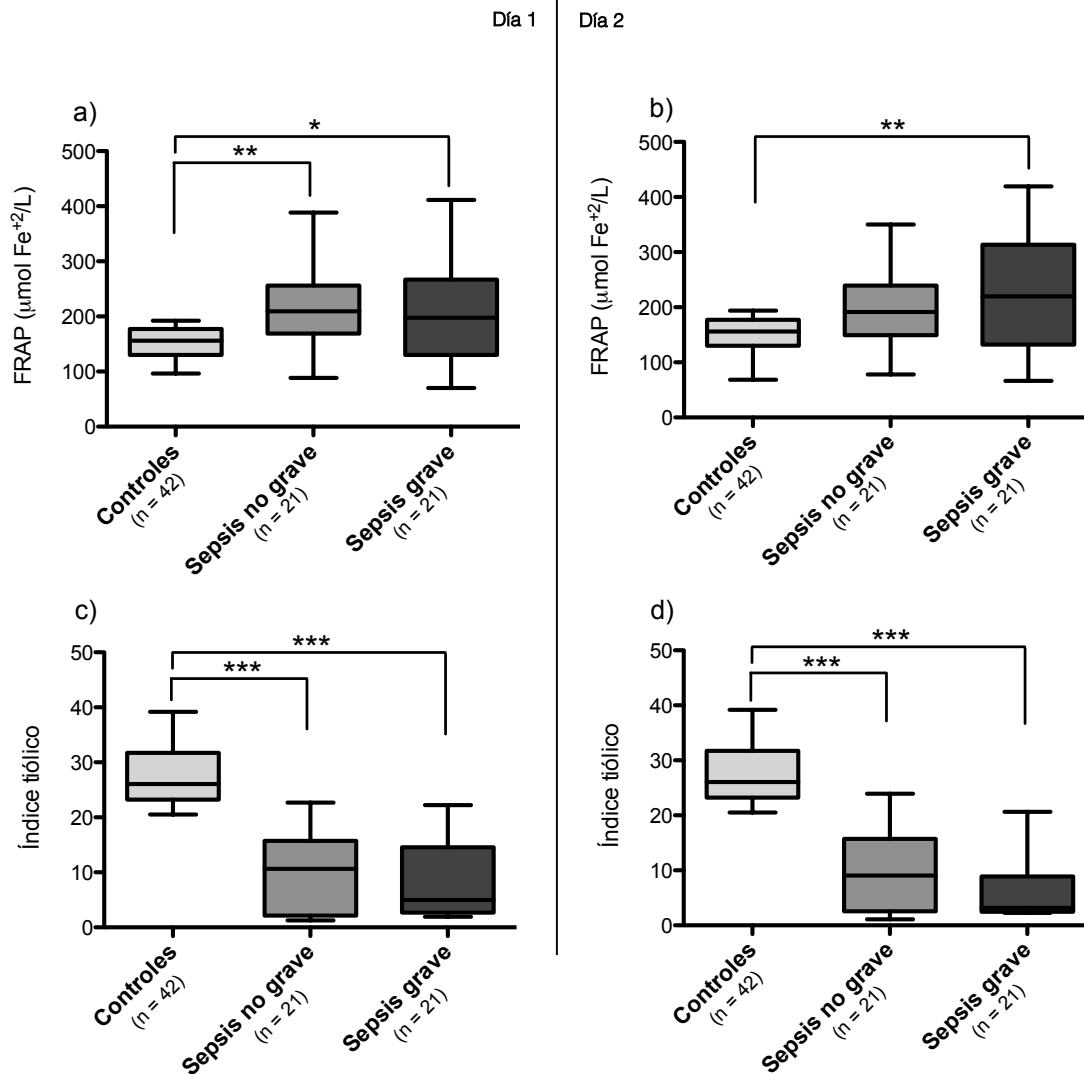


Fig. 10. Mecanismos antioxidantes no enzimáticos según clasificación del cuadro clínico en sepsis no grave y sepsis grave. a) FRAP – día 1; b) FRAP día – 2; c) índice tiólico – día 1; d) índice tiólico – día 2. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. FRAP, *ferric reducing ability of plasma*.

En análisis de acuerdo a mortalidad estimada por score PELOD mostró un mayor nivel de FRAP en los pacientes con probabilidad de morir > 10% en relación a aquéllos con probabilidad < 1%, en el segundo día de seguimiento. No se observaron diferencias en el nivel de FRAP al primer día de seguimiento, ni en el de índice tiólico en ambos días evaluados (Figura 11).

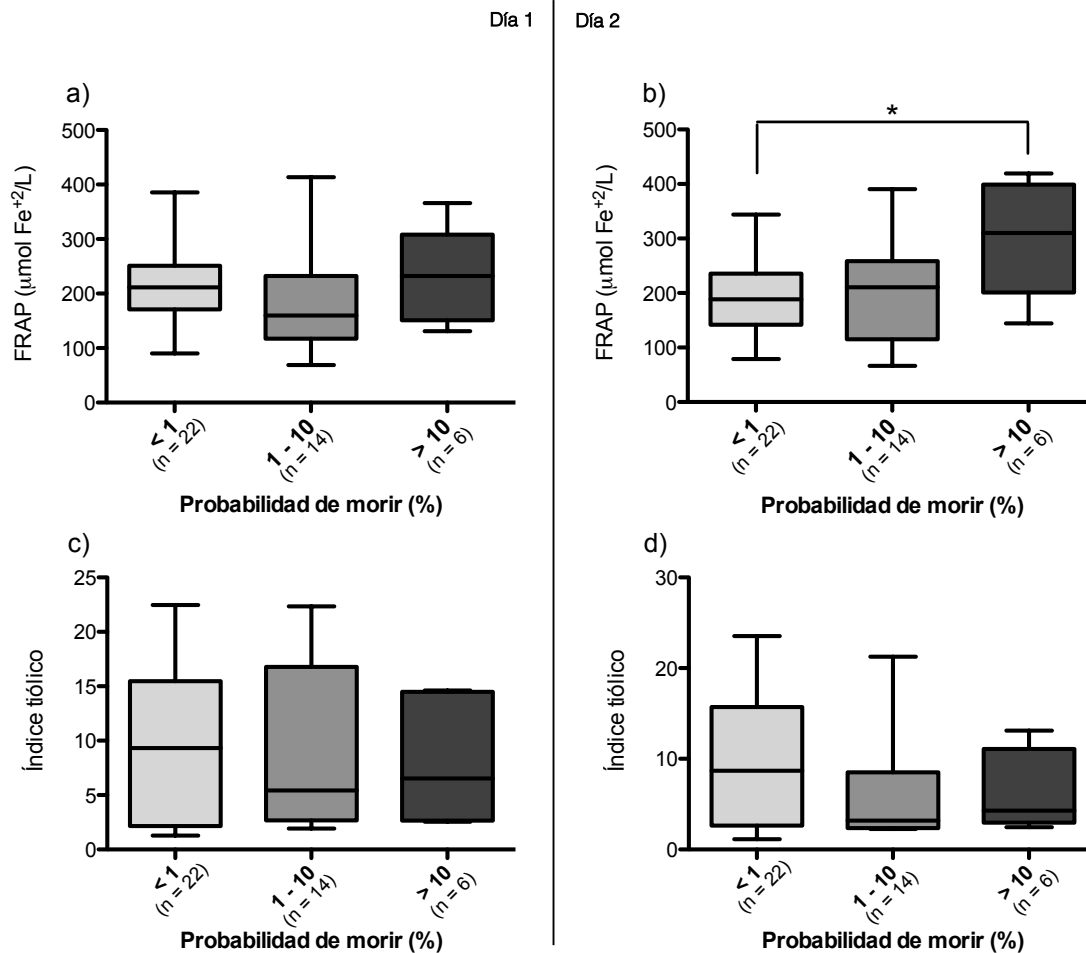


Fig. 11. Mecanismos antioxidantes no enzimáticos según clasificación por probabilidad de morir de acuerdo a score *PELOD*. a) FRAP – día 1; b) FRAP día – 2; c) índice tióico – día 1; d) índice tióico – día 2. * $p < 0,05$. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. FRAP, *ferric reducing ability of plasma*; *PELOD*, *pediatric logistic organ dysfunction*.

La comparación de acuerdo al número de DVA utilizadas mostró que los pacientes que requirieron 3 o más DVA presentaron un valor de FRAP más elevado al primer y segundo día de hospitalización en UPCP. En el caso del índice tióico, no se encontraron diferencias de acuerdo a esta clasificación de gravedad clínica (Figura 12).

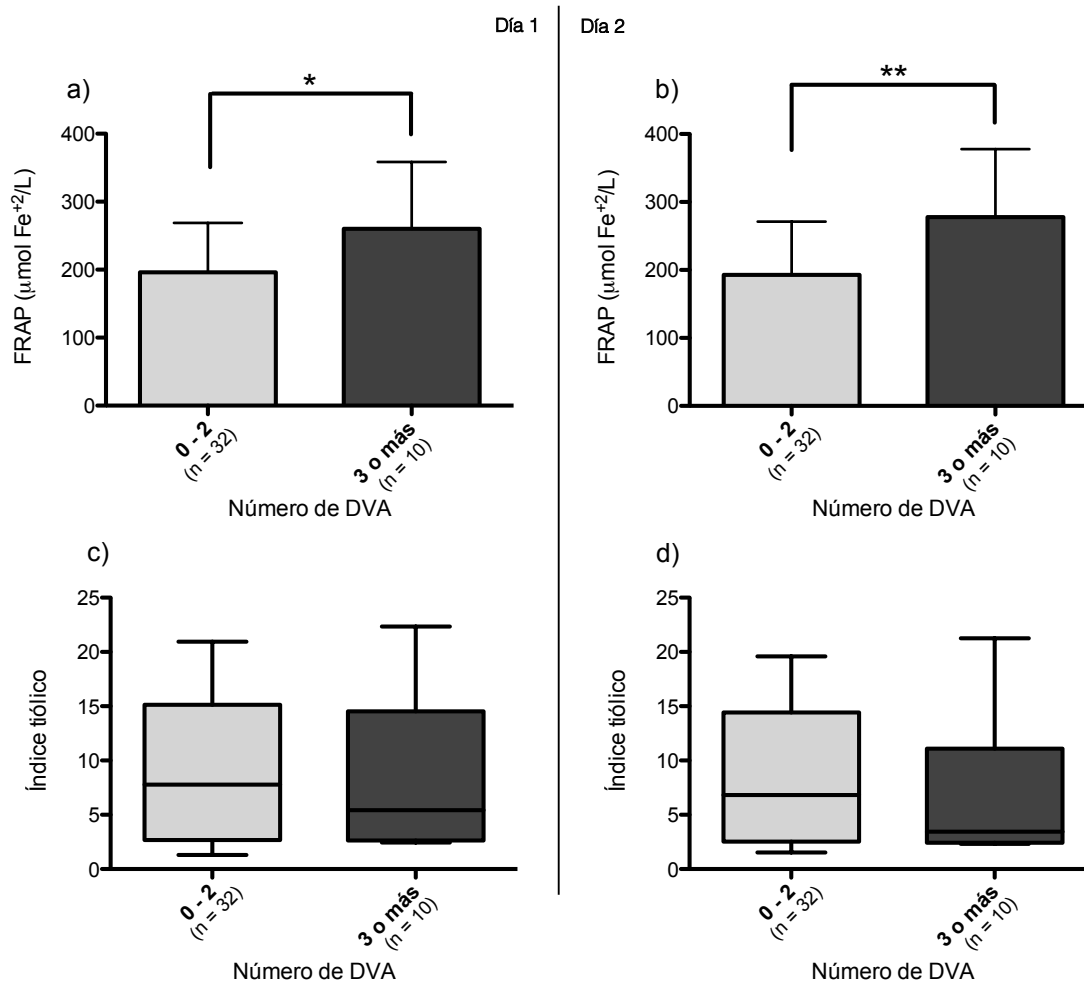


Fig. 12. Mecanismos antioxidantes no enzimáticos según clasificación de acuerdo al número de drogas vasoactivas requeridas. a) FRAP – día 1; b) FRAP día – 2; c) índice tiólico – día 1; d) índice tiólico – día 2. *p < 0,05; **p < 0,01. Barras, media + DE. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. FRAP, *ferric reducing ability of plasma*; DVA, *drogas vasoactivas*.

La evaluación de mecanismos de defensa antioxidante no enzimática en relación a duración de la estadía en UPCP, duración total de hospitalización, duración del requerimiento de VMI y duración del requerimiento de DVA no mostró correlación. Tampoco se observó correlación de estos biomarcadores con los días de evolución del cuadro previo al ingreso a UPCP. Se realizó también este análisis en el subgrupo de pacientes con sepsis grave, sin encontrarse asociación.

6.3.2. Mecanismos de defensa antioxidante enzimática

Se observó una menor actividad de SOD en pacientes con sepsis no grave y sepsis grave en relación a controles en ambos días evaluados, pero no se observaron diferencias en relación a la gravedad de la evolución clínica (Figuras 13-a y 13-b). Se encontró una menor actividad de catalasa en pacientes con sepsis grave, tanto en relación a controles como a pacientes con sepsis no grave, en ambos días evaluados (Figuras 13-c y 13-d). En el caso de GSHPx se observó un aumento de su actividad en los pacientes con sepsis no grave en relación a controles, pero no así en el caso de los pacientes con sepsis grave, sin haber diferencias entre los dos grupos de pacientes sépticos (Figuras 13-e y 13-f).

El análisis según probabilidad de morir estimada por score PELOD mostró un menor valor de CAT al primer día en los pacientes con probabilidad de morir > 10% en relación a aquellos con probabilidad de morir < 1%; mientras que al segundo día se observó un menor valor de CAT en el grupo con probabilidad de morir de 1 – 10% en relación al grupo con probabilidad de morir < 1%. En el caso de SOD y GSHPx no se observaron diferencias entre estos grupos (Figura 14).

Al clasificar a los pacientes según el uso de DVA, no se encontró diferencia en la actividad de ninguna de las enzimas antioxidantes evaluadas entre los pacientes que requirieron 0 – 2 DVA y aquéllos que requirieron 3 o más DVA (Figura 15).

No se encontró correlación entre la actividad de enzimas antioxidantes y duración de la estadía en UPCP, duración total de hospitalización, duración del requerimiento de VMI y duración del requerimiento de DVA. Tampoco se observó correlación de estos biomarcadores con los días de evolución del cuadro previo al ingreso a UPCP. Sin embargo, al realizar este análisis en el subgrupo de pacientes con sepsis grave se encontró una correlación positiva entre la actividad de SOD al día 1 y la duración de hospitalización en UPCP ($p < 0,05$), la duración total de hospitalización ($p < 0,01$), la duración de VMI ($p < 0,001$) y la duración total de apoyo vasoactivo ($p < 0,05$). La gráfica de estas correlaciones se muestra en la Figura 16.

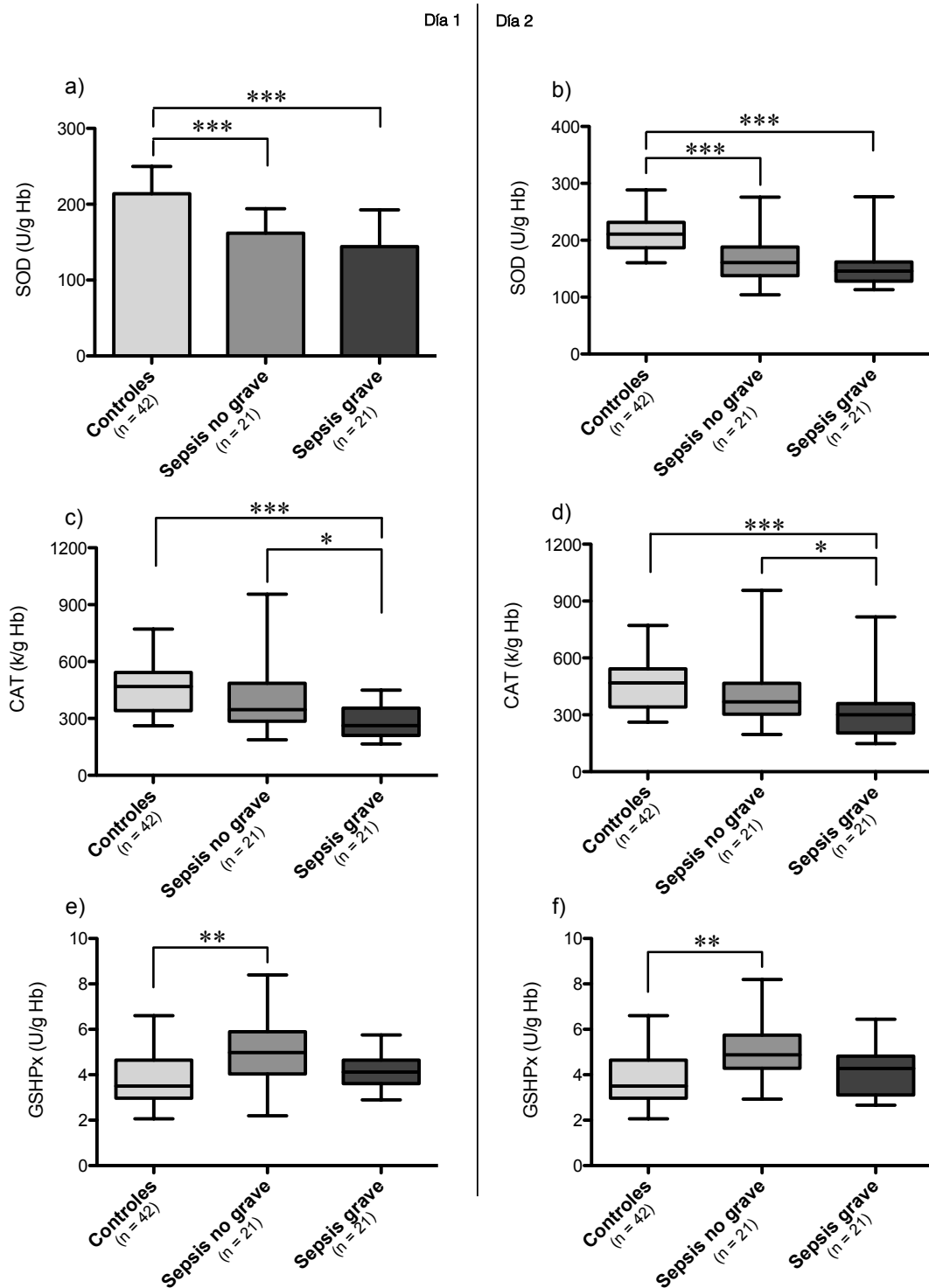


Fig. 13. Actividad enzimática antioxidante según gravedad de la evolución del cuadro clínico en sepsis no grave o sepsis grave. a) SOD - día 1; b) SOD - día 2; c) CAT - día 1; d) CAT - día 2; e) GSHPx - día 1; f) GSHPx - día 2. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. Barras, media + DE. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GSHPx, glutatión peroxidasa.

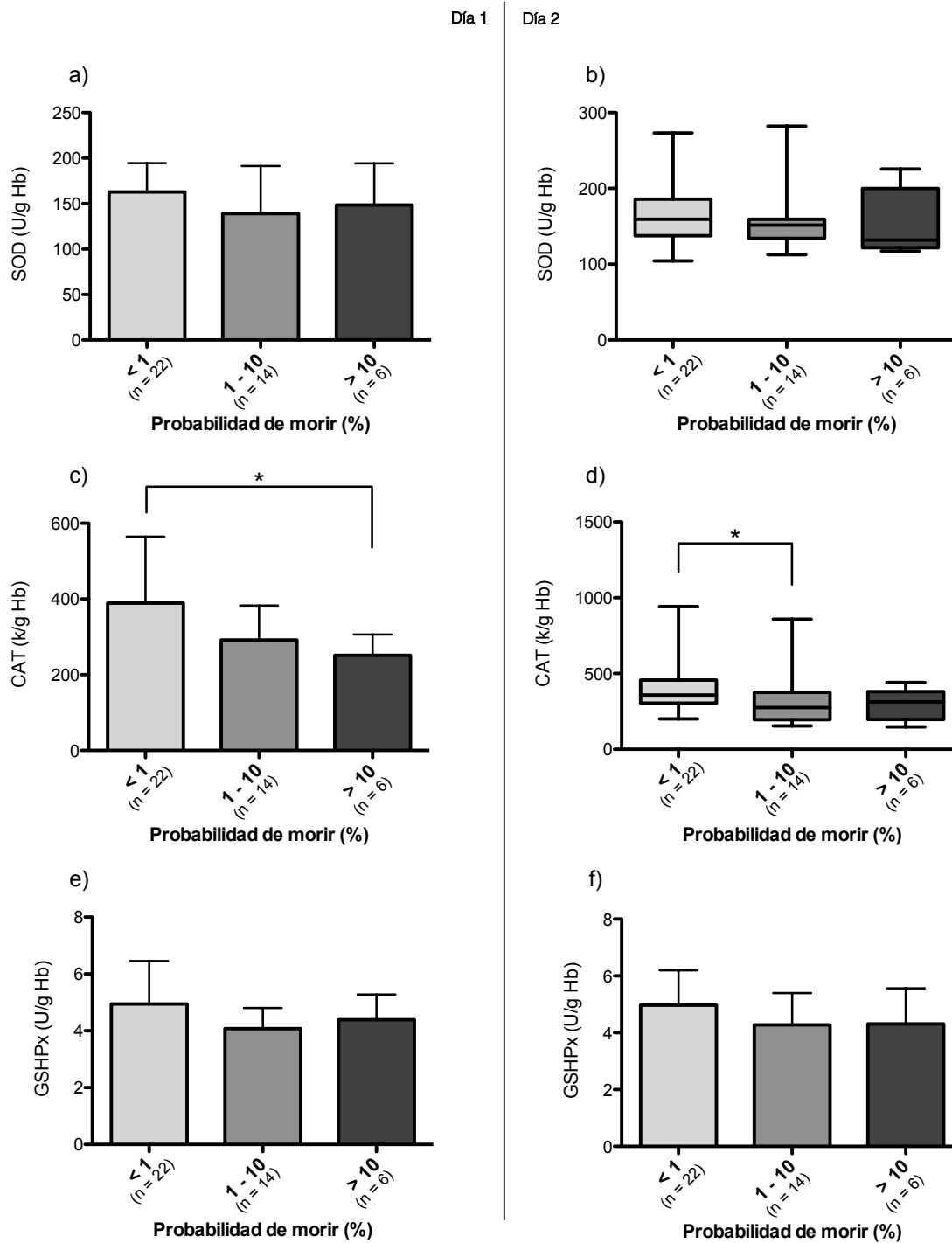


Fig. 14. Actividad enzimática antioxidante según clasificación por probabilidad de morir de acuerdo a score PELOD. a) SOD - día 1; b) SOD - día 2; c) CAT - día 1; d) CAT - día 2; e) GSHPx - día 1; f) GSHPx - día 2. * $p < 0,05$. Barras, media + DE. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. SOD, *superóxido dismutasa*; CAT, *catalasa*; GSHPx, *glutatión peroxidasa*.

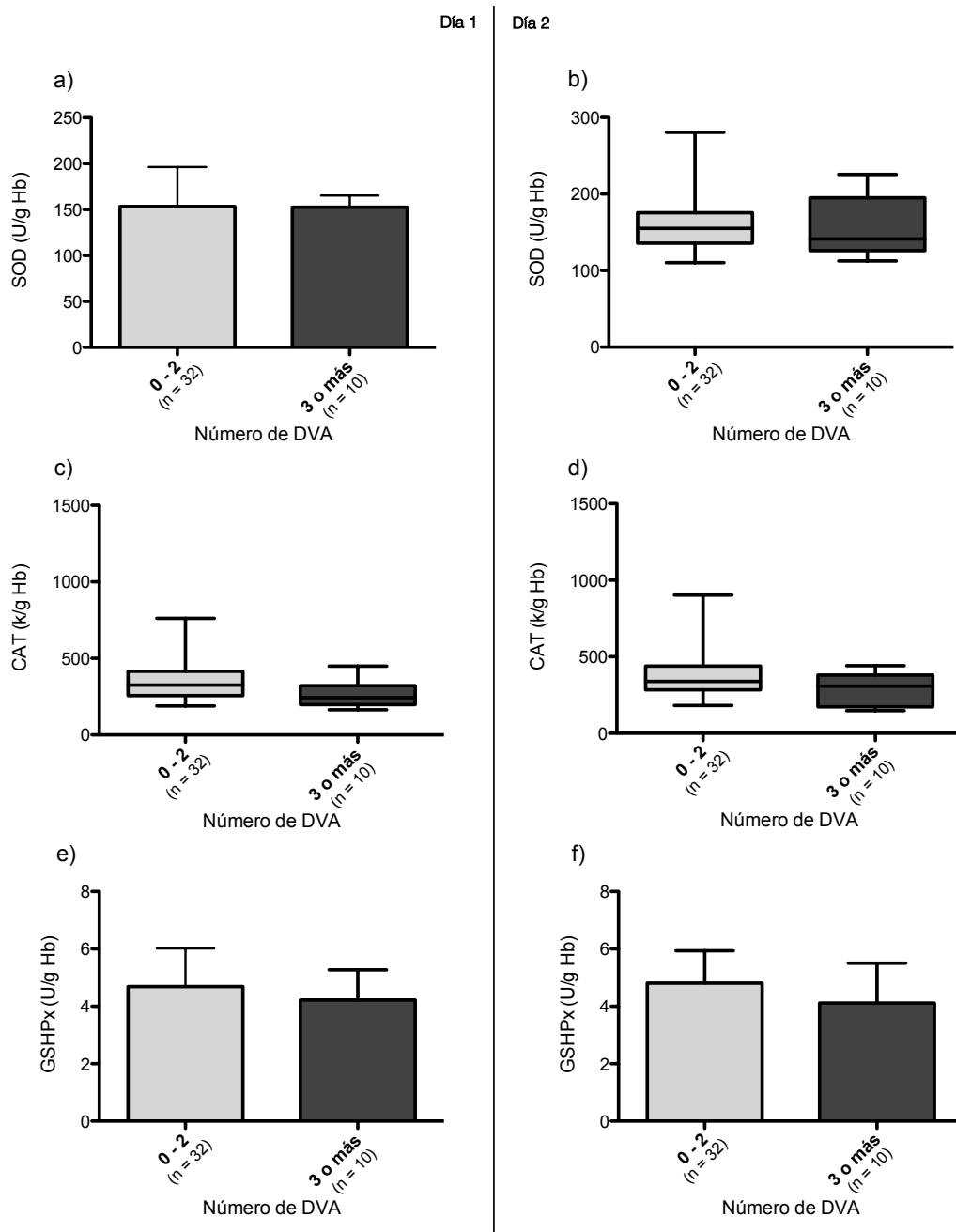


Fig. 15. Actividad enzimática antioxidante según clasificación de acuerdo al número de DVA requeridas. a) SOD - día 1; b) SOD - día 2; c) CAT - día 1; d) CAT - día 2; e) GSHPx - día 1; f) GSHPx - día 2. No se observan diferencias significativas. Barras, media + DE. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GSHPx, glutatión peroxidasa.

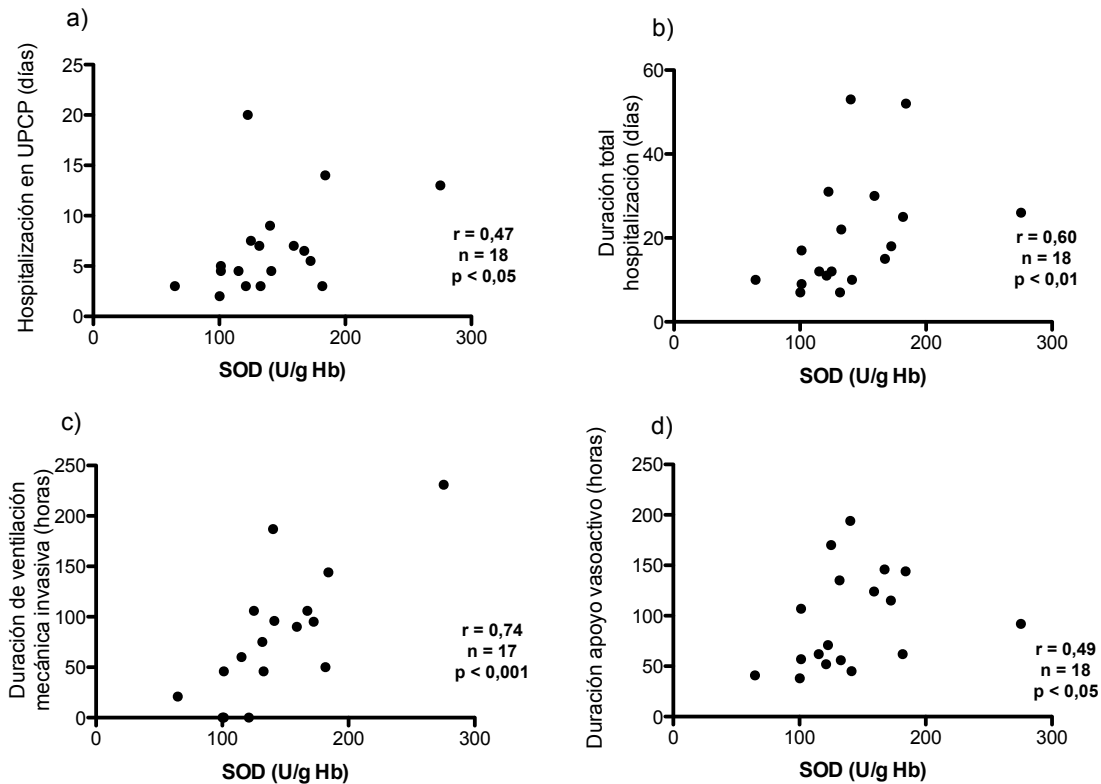


Fig. 16. Correlación entre actividad de SOD y estimadores continuos de gravedad clínica al día 1 de hospitalización en pacientes con sepsis grave; a) duración de hospitalización en UPCP; b) duración total de hospitalización; c) duración de ventilación mecánica invasiva; d) duración de requerimiento de apoyo vasoactivo. *SOD*, *superóxido dismutasa*.

6.3.3. Biomarcadores de daño oxidativo

Los pacientes con sepsis no grave y sepsis grave mostraron mayores niveles plasmáticos de lipoperoxidación (F_2 -isoprostanos) en relación a controles en ambos días evaluados, pero no se observaron diferencias en relación a la gravedad del cuadro clínico (Figuras 17-a y 17-b). No se observaron diferencias en la concentración plasmática de carbonilos proteicos entre estos tres grupos en ninguno de los dos días evaluados (Figuras 17-c y 17-d).

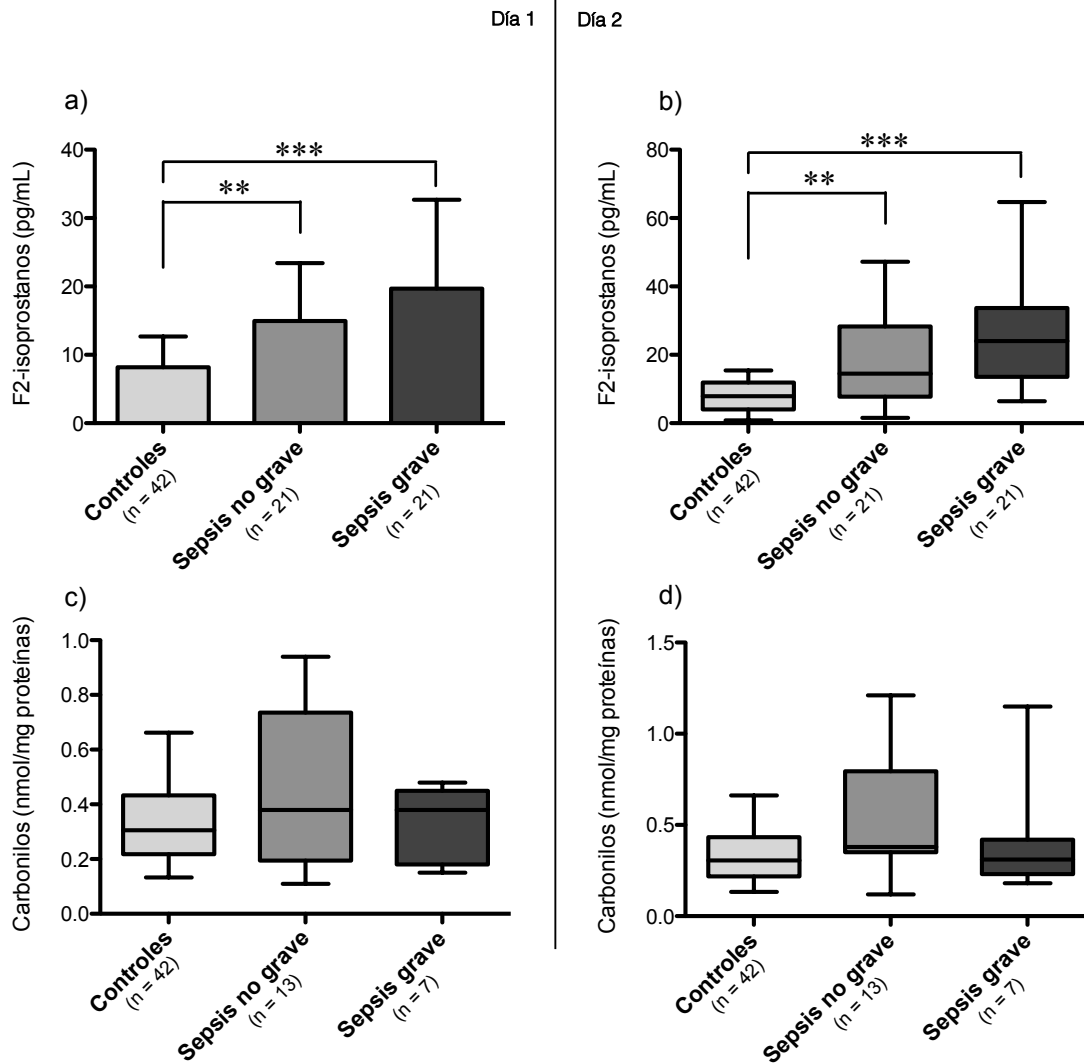


Fig 17. Daño oxidativo según gravedad de la evolución de cuadro clínico en sepsis y sepsis grave. a) F₂-isoprostanos - día 1; b) F₂-isoprostanos día 2; c) carbonilos proteicos - día 1; carbonilos proteicos - día 2. **p < 0,01; ***p < 0,001. Barras, media + DE. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95.

Al explorar el daño oxidativo en relación a la probabilidad de morir, se observó que al segundo día de seguimiento los pacientes con probabilidad de morir > 10% presentaban concentraciones plasmáticas de F₂-isoprostanos mayores a aquellos pacientes con probabilidad de morir < 1%. La concentración de carbonilos proteicos no mostró diferencias en ninguno de estos dos días (Figura 18).

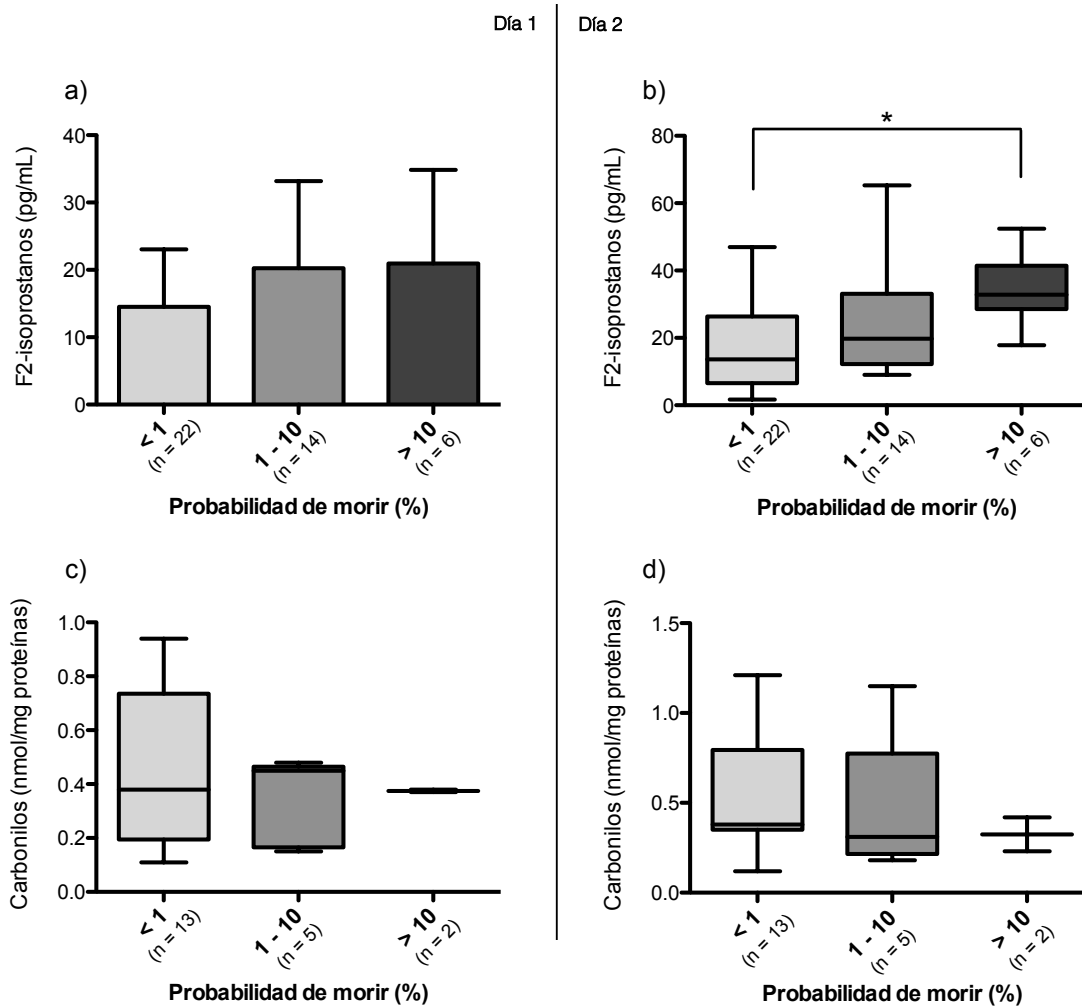


Fig 18. Daño oxidativo según probabilidad de morir estimada por score PELOD. a) F₂-isoprostanos - día 1; b) F₂-isoprostanos - día 2; c) carbonilos proteicos - día 1; carbonilos proteicos - día 2. *p < 0,05. Barras, media + DE. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. *PELOD*, *pediatric logistic organ dysfunction*.

En relación al requerimiento de DVA no se observaron diferencias en los niveles de F₂-isoprostanos ni carbonilos al comparar los pacientes que requirieron 0-2 DVA con los que requirieron 3 o más DVA (Figura 19).

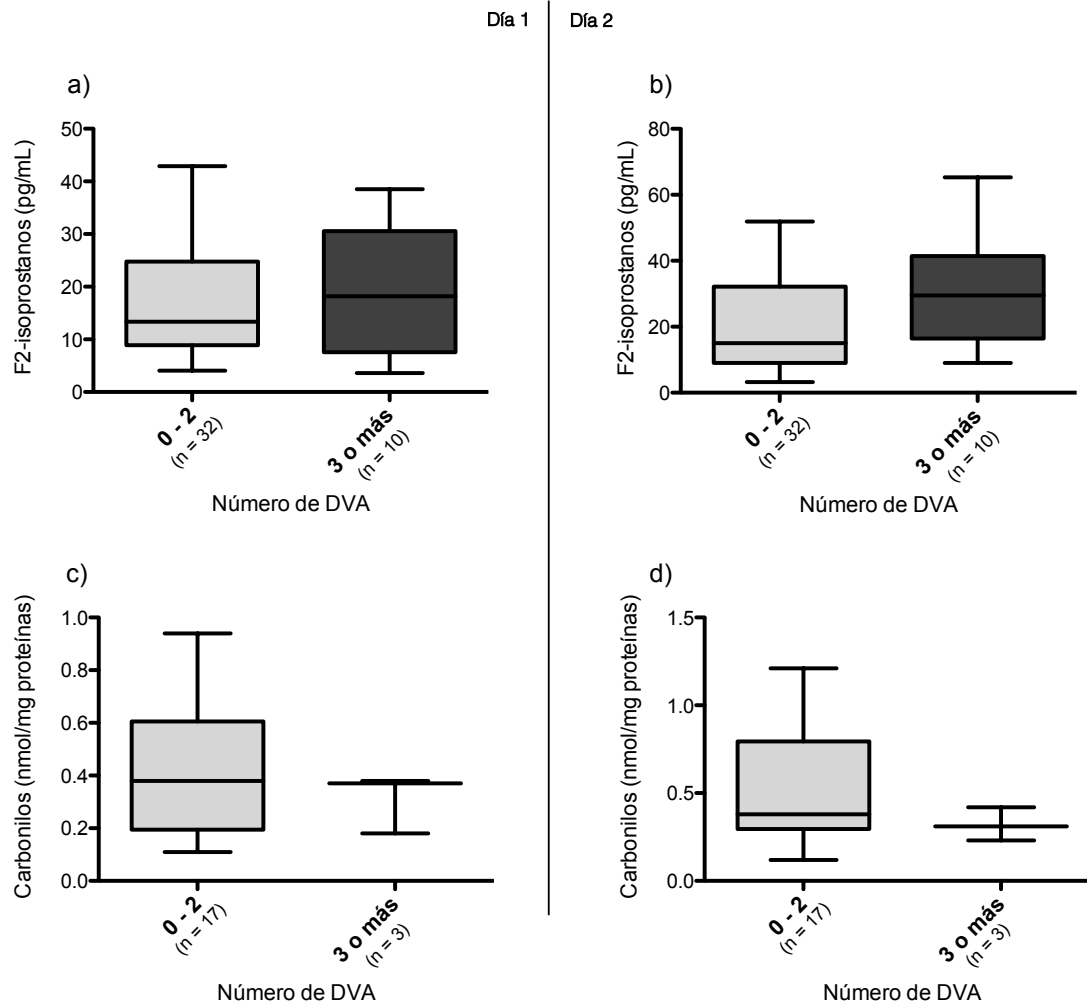


Fig 19. Daño oxidativo según clasificación de acuerdo al número de DVA requeridas. a) F₂-isoprostanos - día 1; b) F₂-isoprostanos día 2; c) carbonilos proteicos - día 1; carbonilos proteicos - día 2. No se observan diferencias significativas. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. DVA, *drogas vasoactivas*.

El análisis de marcadores de daño oxidativo en relación a duración de la estadía en UPCP, duración total de hospitalización, duración del requerimiento de VMI, duración del requerimiento de DVA y el tiempo de evolución del cuadro previo al ingreso a UPCP no mostró correlación. Tampoco se observó correlación al analizar sólo el subgrupo de pacientes con sepsis grave.

6.3.4. Actividad inflamatoria

El análisis de la activación de NF- κ B mostró mayor presencia nuclear de las subunidades p50 y p65 en los pacientes con sepsis grave en relación a aquéllos con sepsis no grave (Figura 20).

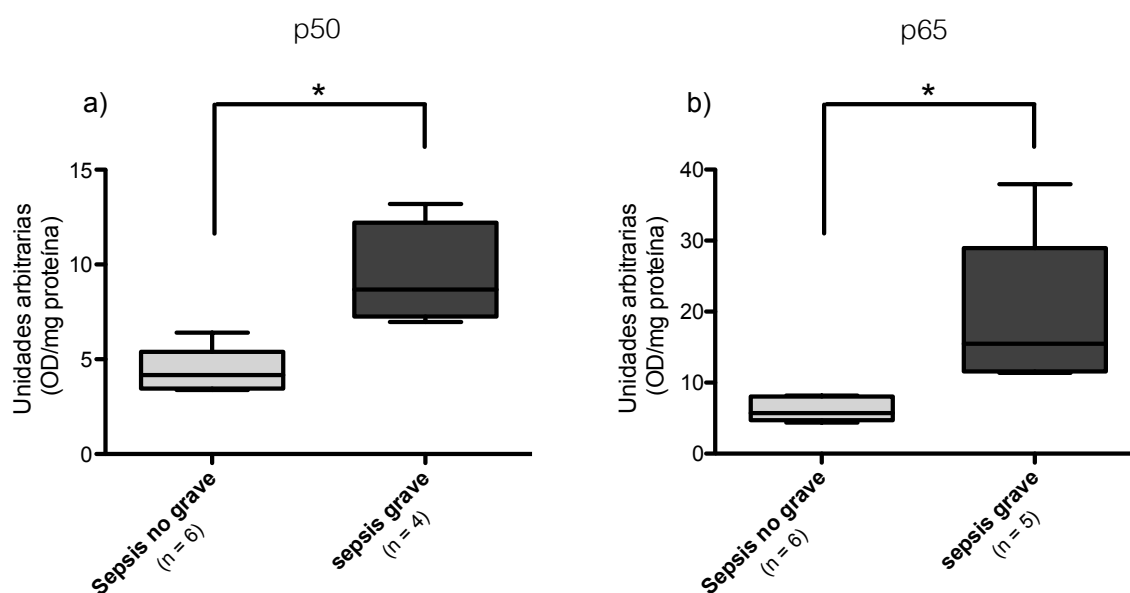


Fig. 20. Activación de NF- κ B en pacientes con sepsis no grave y sepsis grave. a) p50; b) p65. * $p < 0,01$. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95.

6.4. Biomarcadores de estrés oxidativo según etiología bacteriana del cuadro

Se clasificó a los pacientes de acuerdo a etiología confirmada o sospechada por bacterias gram-positivas (incluye cuadros de escarlatina quirúrgica sin aislamiento microbiano) o gram-negativas (incluye cuadros de abdomen agudo sin aislamiento microbiano). No se encontraron diferencias al primer y segundo día de evolución en UPCP entre estos dos grupos en ninguno de los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados. Los resultados del día 1 de hospitalización en UPCP se grafican en la Figura 21. Se compararon además los niveles de estos biomarcadores entre el grupo de pacientes con bacteriemia confirmada y aquéllos con hemocultivo negativo, sin encontrarse diferencias en los primeros dos días de hospitalización en UPCP. Los valores de los biomarcadores de estrés oxidativo

explorados al día 1 en estos dos grupos se muestran en la Figura 22. Se realizó también análisis de acuerdo a etiología bacteriana y positividad de hemocultivo en el subgrupo de pacientes con sepsis grave, sin encontrarse diferencias significativas.

6.5. *Evolución de biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con sepsis*

Se exploró la evolución temporal de los biomarcadores de estrés oxidativo determinados hasta el día 5 de hospitalización en UPCP en pacientes con sepsis. No se encontraron cambios en los biomarcadores en el tiempo (Figura 23). Se realizó también este análisis según clasificación del cuadro en sepsis no grave y sepsis grave, sin encontrarse cambios de los biomarcadores determinados entre los días 1 a 5 de hospitalización en UPCP en ninguno de estos dos grupos. Al comparar a los pacientes con sepsis no grave y sepsis grave sólo se observó la ya descrita diferencia en la actividad de CAT al día 1 y 2 (Figura 24).

6.6. *Utilidad de los biomarcadores de estrés oxidativo como predictores de evolución clínica (objetivo específico 4)*

Mediante análisis multivariante se analizó el poder predictor de todos los biomarcadores de estrés oxidativo determinados (biomarcadores de defensa antioxidante no enzimática, defensa antioxidante enzimática y de daño oxidativo) en relación a evolución de mayor gravedad, mediante métodos de regresión que determinan la contribución potencial de uno o más biomarcadores a un *outcome* de gravedad definido. Mediante regresión logística se evaluaron los biomarcadores estudiados en los días 1 y 2, según clasificación dicotómica en sepsis no grave y sepsis grave, sin encontrarse asociación con alguno de los biomarcadores estudiados. Se realizó además una regresión ordinal para análisis de la variable PELOD en relación a los biomarcadores evaluados en los días 1 y 2, sin encontrarse asociación con ninguno de los biomarcadores estudiados. Finalmente, se hizo un análisis mediante regresión de Cox en relación a duración de la estadía en UCI, duración total de hospitalización y días de requerimiento de VMI, sin lograrse demostrar una asociación.

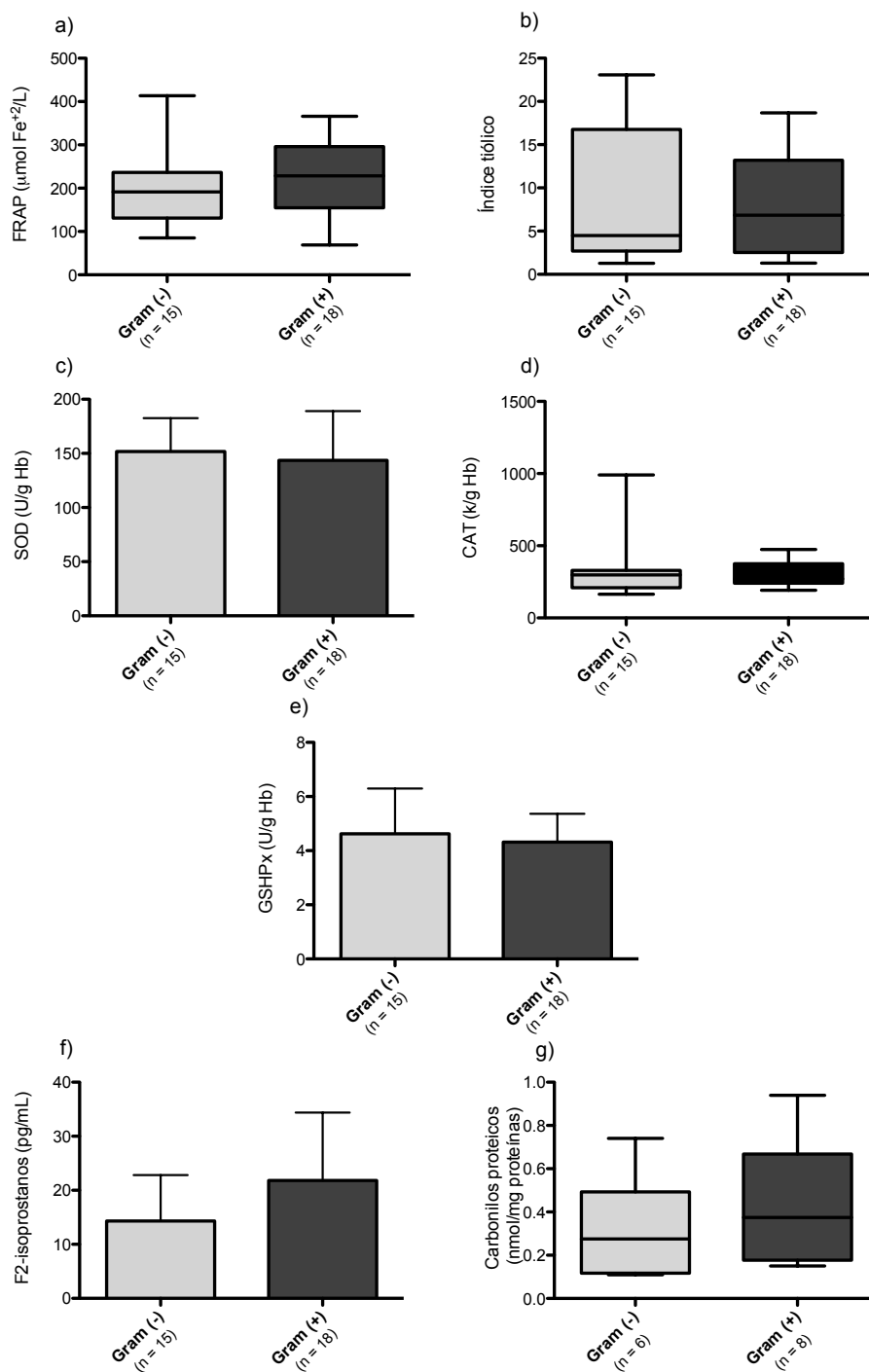


Fig. 21. Comparación de biomarcadores de estrés oxidativo según infección por patógeno gram (-) o gram (+) al primer día de hospitalización en UCP. No se observan diferencias estadísticamente significativas. Barras, media + DE. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. *FRAP*, ferric reducing ability of plasma; *SOD*, superóxido dismutasa; *CAT*, catalasa; *GSHPx*, glutatión peroxidasa; (-), negativo; (+), positivo.

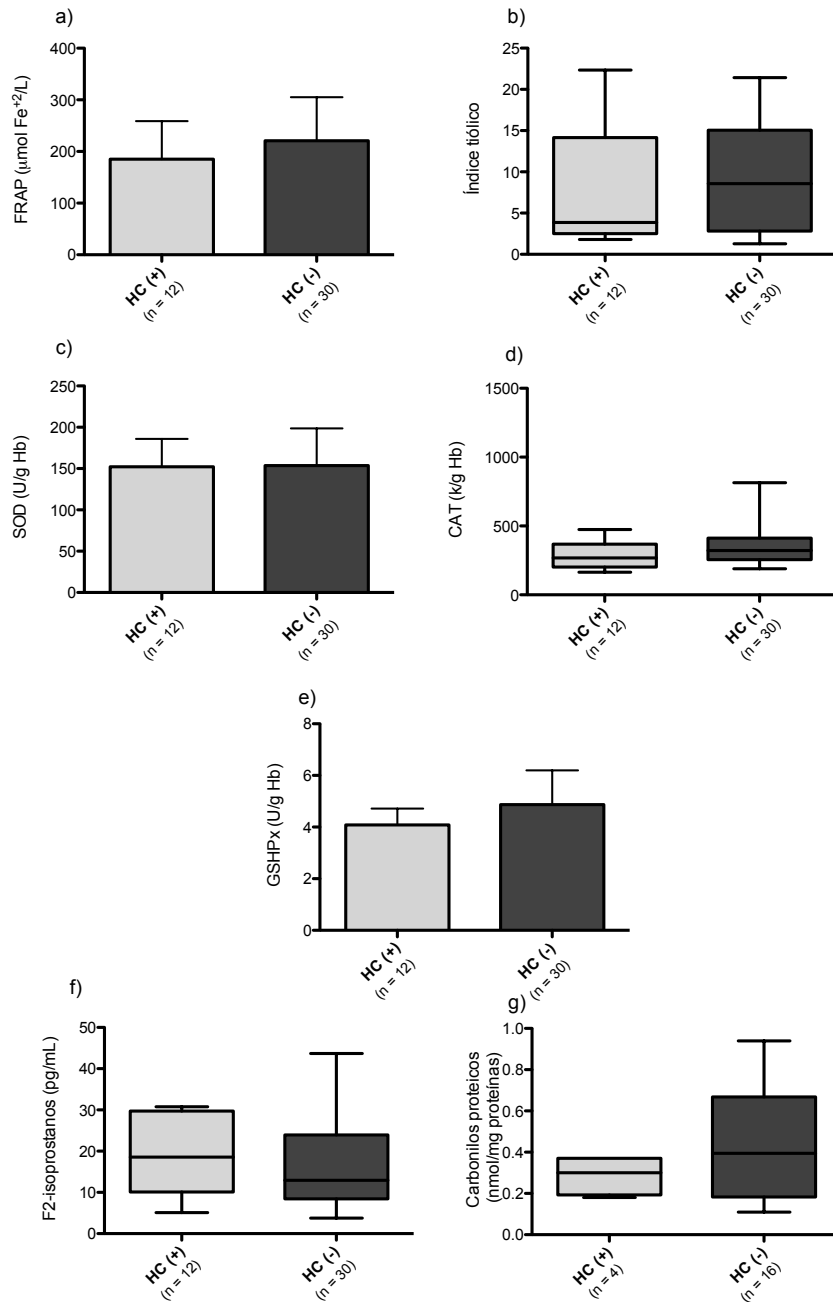


Fig. 22. Comparación de biomarcadores de estrés oxidativo según positividad de hemocultivo al primer día de hospitalización en UCP. No se observan diferencias estadísticamente significativas. Barras, media + DE. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95. HC (+), hemocultivo positivo; HC (-), hemocultivo negativo; FRAP, ferric reducing ability of plasma; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GSHPx, glutatión peroxidasa.

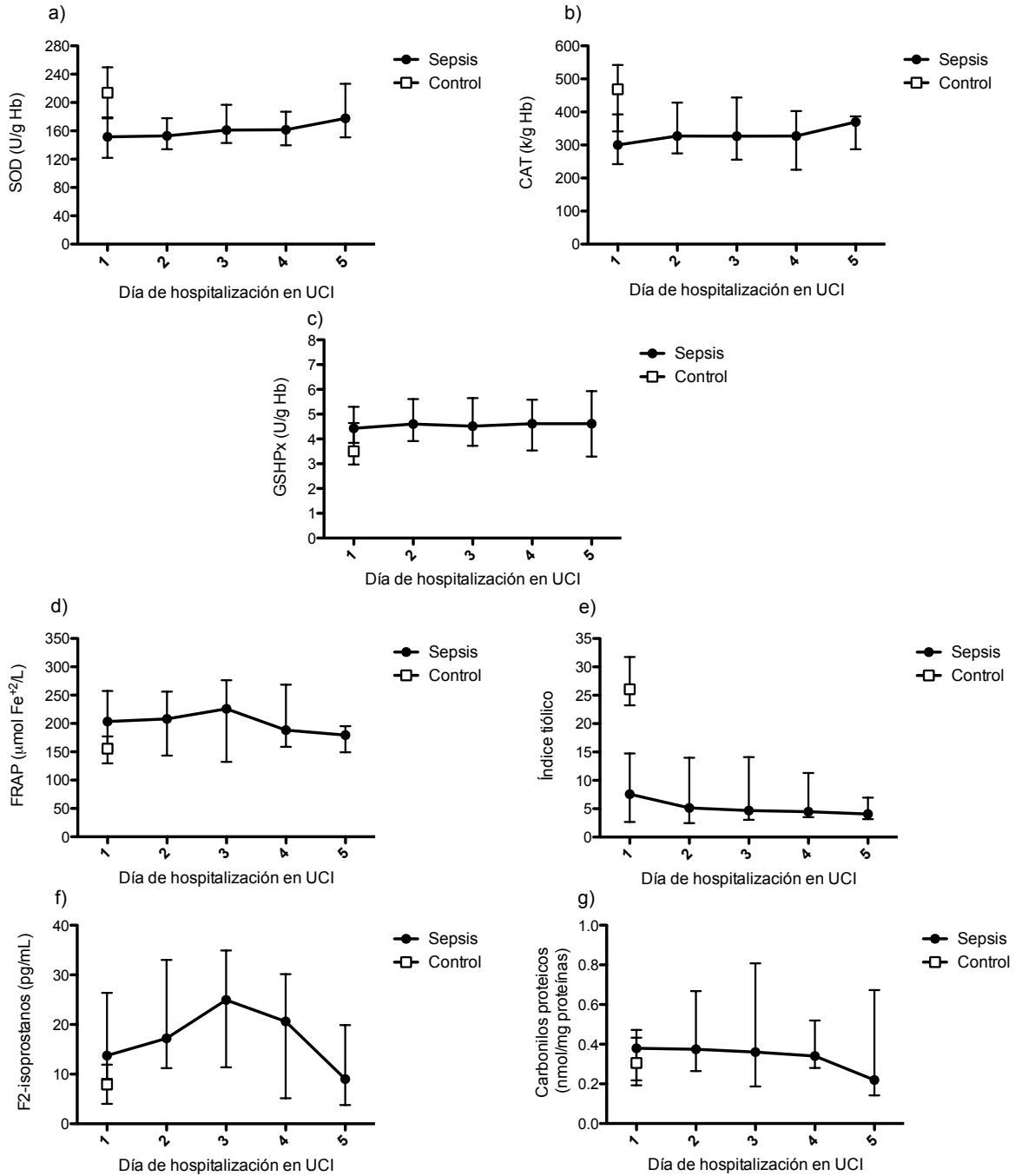


Fig. 23. Evolución de biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con sepsis hasta el día 5 de hospitalización en UPCI. No se expresa significancia estadística entre controles y pacientes. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los días evaluados. Se muestra mediana y rango intercuartílico. En a), b), c), d), e) y f) *n* de sepsis, días 1 al 5: 42, 42, 27, 21 y 18, respectivamente; en g) *n* de sepsis, días 1 al 5: 20, 20, 10, 7 y 6, respectivamente. Control, *n* = 42. FRAP, ferric reducing ability of plasma; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GSHPx, glutatión peroxidasa.

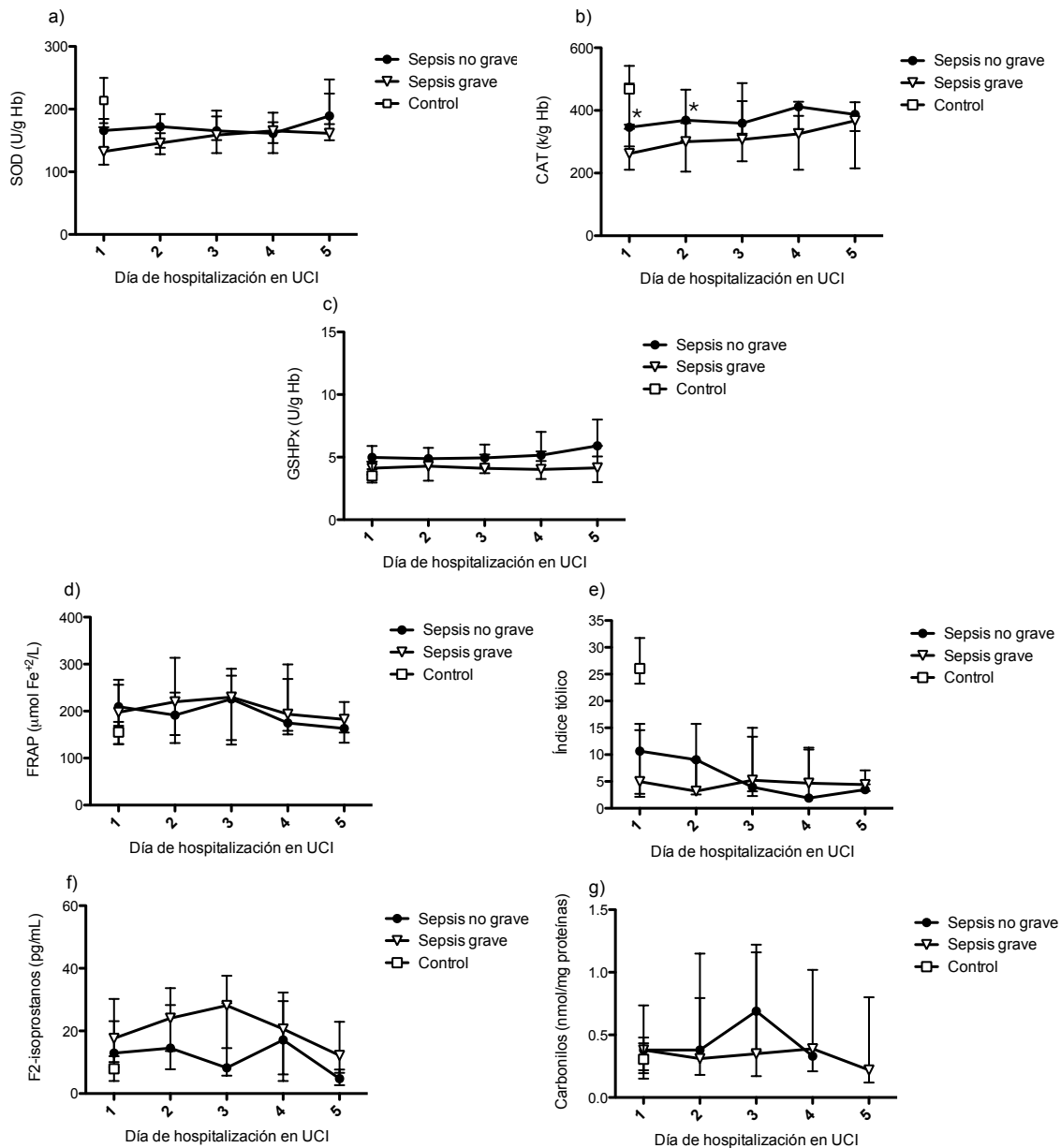


Fig. 24. Evolución de biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con sepsis no grave y sepsis grave hasta el día 5 de hospitalización en UPCI. No se expresa significancia estadística entre controles y pacientes. * $p < 0,05$ entre sepsis no grave y sepsis grave. Se muestra mediana y rango intercuartílico. En a), b), c), d), e) y f) n de sepsis no grave, días 1 al 5: 21, 21, 7, 4 y 3, respectivamente; en g) n de sepsis no grave, días 1 al 5: 13, 13, 3, 1 y 0, respectivamente. En a), b), c), d), e) y f) n de sepsis grave, días 1 al 5: 21, 21, 20, 17 y 15, respectivamente; en g) n de sepsis no grave, días 1 al 5: 7, 7, 7, 6 y 6, respectivamente. Control, $n = 42$. FRAP, ferric reducing ability of plasma; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GSHPx, glutatión peroxidasa.

7. Discusión

Esta tesis corresponde a un estudio prospectivo observacional que sustenta la hipótesis de que en el desarrollo de la sepsis en niños se producen cambios en los mecanismos de regulación del balance pro-oxidante y anti-oxidante, lo que se asocia a un mayor daño lipoperoxidativo extracelular. Se expone además la ocurrencia de cambios en algunos de estos biomarcadores en pacientes con evolución de mayor gravedad, pero no fue posible establecer la utilidad de alguno de éstos como predictor de evolución clínica.

Biomarcadores de estrés oxidativo en población control. Se logró reclutar un grupo de 49 sujetos menores de 7 años, sin patología infecciosa aguda, ni otro tipo de patología fuera de la causa que motivaba la intervención quirúrgica electiva. En estos sujetos se determinaron niveles de biomarcadores de defensa antioxidante no enzimática y enzimática, y biomarcadores de daño oxidativo. No fue posible reclutar a un grupo de sujetos estrictamente sanos debido a las limitaciones éticas que implicaría este tipo de estudio. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de estos biomarcadores en los distintos subgrupos de patologías que motivaban la intervención quirúrgica, por lo que no es esperable que el tipo de patología en estos sujetos condicione cambios en estos biomarcadores. Previo al presente trabajo hay escasos reportes respecto a los niveles de los biomarcadores evaluados en población pediátrica control (excluyendo a la población neonatal), describiéndose: (1) el índice GSSG/GSH en sangre total [66], (2) la concentración de GSH en sangre total [80] y (3) las concentraciones de TBARs, GSH y actividad de SOD en eritrocitos [67]. No se encontraron diferencias en los niveles de estos biomarcadores respecto al género en este grupo. Dentro del rango etario evaluado fue posible observar que a mayor edad hay un aumento de la actividad de SOD y una disminución de la capacidad antioxidante plasmática. Aunque la correlación en estos dos casos es discreta, este grupo sólo comprendía hasta los 7 años de edad, por lo que no es posible establecer el comportamiento de estos dos biomarcadores en el resto del rango de edad pediátrico. De mantenerse esta tendencia en el resto del rango de edad pediátrico esta correlación podría ser de

mayor fuerza. Este es el primer reporte que da cuenta de esta asociación en población pediátrica. Sin embargo, hay trabajos que refieren menor actividad de SOD eritrocitaria en recién nacidos de pretérmino (RNPT) [81], además de un aumento de actividad de SOD eritrocitaria a los 68 días de vida, con respecto al tercer día de vida, en RNPT con peso de nacimiento menor a 1000 g [82]. Es posible que en la población pediátrica exista un aumento de la actividad de esta enzima en el glóbulo rojo desde el período fetal, lo que, asociado a las otras alteraciones de mecanismos de defensa antioxidante [81], podría explicar en parte la menor capacidad del RNPT de tolerar una injuria oxidativa, dando lugar a patologías como displasia broncopulmonar y retinopatía del prematuro [83]. Adicionalmente, la alteración de los mecanismos de defensa antioxidante podría contribuir a la mayor mortalidad observada en casos de sepsis en pacientes neonatos [84-86]. Es necesario evaluar el comportamiento de los biomarcadores de estrés oxidativo en el rango completo de edad pediátrica a fin de aclarar su evolución en el tiempo en esta población. En el caso de los pacientes adultos, reportes previos han referido una potencial disminución de la actividad de SOD a edades mayores, dada la similitud de los cambios tisulares observados en modelos animales de deficiencia de SOD con patología asociada al envejecimiento [87], especialmente ósea [88]. Sin embargo, esto aún no ha sido apropiadamente evaluado.

Biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con diagnóstico de sepsis. Se reclutó un grupo estudio de 42 pacientes con diagnóstico de sepsis y un grupo control pareado por edad y sexo, extraído del grupo inicial de 49 pacientes sin patología infecciosa aguda. La definición de sepsis utilizada es la definición operativa actualmente aceptada [5]. Sin embargo, debe considerarse que ésta corresponde a una respuesta sistémica a la infección, de gravedad variable según tiempo de evolución, agente, huésped y manejo del cuadro clínico, por lo que incluye a un grupo heterogéneo de pacientes que no necesariamente están cursando con una respuesta inflamatoria exacerbada. De esta manera, la definición de sepsis es un tanto inespecífica en la selección de pacientes con

cuadros infecciosos de evolución más grave.

Se observó que los pacientes con sepsis presentan niveles mayores de capacidad antioxidante plasmática en los primeros dos días de hospitalización en UPCP, lo que parece ir en contra de la hipótesis de una disminución de los mecanismos de defensa antioxidante en estos pacientes. Este es el primer estudio en que se reporta un aumento de la capacidad antioxidante plasmática en pacientes pediátricos con sepsis. Reportes previos han mostrado resultados contradictorios en relación a la capacidad antioxidante plasmática en pacientes sépticos adultos. El trabajo de Cowley *et al* [54] mostró menores niveles de potencial antioxidante plasmático en pacientes adultos con sepsis. Por el contrario, otros estudios han demostrado mayor nivel de TRAP (peroxyl radical trapping antioxidant parameter) en plasma [89] y suero [90] de pacientes adultos con sepsis, y en plasma desproteinizado de pacientes con SIRS de distintas causas [45]. Es posible que las discrepancias en estos resultados se deban a la muestra estudiada (plasma total, plasma desproteinizado o suero), o a la técnica utilizada. La técnica de TRAP utiliza luminiscencia de luminol frente a la producción de radical peroxilo [45,89,90], mientras que la técnica espectrofotométrica utilizada por otros estudios se basa en la producción de un metabolito oxidado distinto, como fenotiazina [54], o la producción de una molécula reducida, como es el caso de la técnica de FRAP utilizada en este trabajo. La contribución relativa de cada uno de los componentes de la capacidad antioxidante plasmática es diferente en cada una de las técnicas, debido a la distinta capacidad de cada componente para reaccionar con el marcador utilizado [90]. En el caso de FRAP, los componentes que dan cuenta de la capacidad antioxidante son: vitamina C, vitamina E, ácido úrico, bilirrubina, proteínas y “otros antioxidantes” [72]. En algunos de estos estudios se ha atribuido el aumento de la capacidad antioxidante a la mayor concentración de ácido úrico, que tendría una contribución relativa más relevante en el caso de TRAP [90]. Sin embargo, en el presente trabajo se corrigió el valor de FRAP por la concentración de ácido úrico, por lo que éste no sería responsable de los resultados observados. Además, se ha observado que las concentraciones de vitamina C [67,91] y

vitamina E [53,91] se encuentran disminuidas en pacientes con sepsis, y es usual que los pacientes con sepsis cursen con hipoalbuminemia [91,92]. Es posible que los cambios observados se deban en parte a la presencia de mayor concentración de bilirrubina (no determinada en este estudio) y antioxidantes no identificados, los que han demostrado contribuir más en la capacidad antioxidante plasmática de pacientes con SIRS que no sobreviven [45]. Los pacientes adultos con sepsis presentan valores más elevados de bilirrubina [91], debido en parte a hemólisis microangiopática en condiciones de coagulación intravascular diseminada, lo que asociado a una mayor actividad de la enzima hem-oxigenasa [93], determinaría la presencia de mayores niveles plasmáticos de bilirrubina. No es esperable que la liberación de Fe^{+2} producto de hemólisis y metabolización del grupo hem interfiera en el ensayo de FRAP, ya que los niveles plasmáticos de hierro libre son del orden micromolar [94], incluso en condiciones de hemólisis [95], mientras que la concentración de Fe^{+3} utilizada en el ensayo es del orden milimolar [72].

Los pacientes con sepsis mostraron un menor nivel de índice tiólico eritrocitario, lo que se explica tanto por una disminución de GSH como por un aumento de GSSG. Estudios previos han mostrado resultados contradictorios con respecto a la concentración de GSH y GSSG en pacientes sépticos. En el trabajo llevado a cabo por Cherian *et al* [67] no se demostraron diferencias en la concentración eritrocitaria de GSH en pacientes pediátricos sépticos con respecto a controles, mientras que en el estudio publicado por Németh *et al* [66] se observó un aumento de la relación GSSG/GSH (recíproco del índice tiólico) en sangre total de pacientes pediátricos con shock séptico en relación a controles. Es probable que la depleción de GSH observada se deba a un mayor consumo en condiciones de un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno, como ocurre en la sepsis, pero también a una disminución de la síntesis de GSH en sangre total durante la sepsis pediátrica [80]. En los pacientes con sepsis se observó además un aumento de la actividad de GSHPx (ver más adelante), por lo que se planteó la posibilidad de que el consumo de GSH estuviera mediado por una mayor actividad de esta enzima. Sin embargo, no se encontró correlación entre la actividad

enzimática de GSHPx y las concentraciones de GSH, por lo que es esperable que esta disminución se deba principalmente a consumo no enzimático de GSH.

En el caso de las enzimas antioxidantes se observó una disminución de la actividad de SOD y CAT. Previamente ha sido reportado en un modelo animal de sepsis un aumento de la actividad de SOD en tejidos [78], mientras que en pacientes sépticos adultos se ha observado un aumento de la actividad de SOD en plasma [79]. Estos resultados no son necesariamente contradictorios dado que un aumento de la actividad de SOD en tejidos puede reflejar una respuesta compensatoria frente a un mayor ambiente prooxidante, mediante mecanismos de inducción de transcripción génica por activación del factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 - related factor 2) mediada por ROS [96]. Por el contrario, no sería posible observar un aumento de la producción de enzimas antioxidantes en el eritrocito dado que éste carece de efectos genómicos debido a la ausencia de núcleo. Adicionalmente, el aumento de SOD plasmática puede reflejar una disminución de SOD extracelular a nivel de tejidos [79], lo que contribuiría a la disminución de las defensas antioxidantes a nivel tisular. Es probable que la disminución observada en la actividad de SOD y CAT se deba a modificaciones oxidativas en presencia de mayor concentración de ROS, como ocurre con H_2O_2 [97], 1O_2 [98] y $O_2^{\cdot-}$ [99]. Por otra parte, fue posible observar un aumento de actividad de GSHPx en pacientes con sepsis. Dado que los eritrocitos no son capaces de aumentar la producción de esta enzima mediante mecanismos de inducción de transcripción génica, es posible que este aumento de actividad se deba a modificaciones post-traduccionales de la enzima. Hasta la fecha el único mecanismo no transcripcional de inducción de la actividad de GSHPx que se ha planteado es el que ocurre frente a la administración de selenio [100], el cual ha demostrado estar disminuido en la sepsis [51]. A pesar del aumento de actividad medida, es esperable que la actividad enzimática de GSHPx no se encuentre aumentada *in vivo* dado los bajos niveles de GSH eritrocitario observados en estos pacientes, y la dependencia de GSH para la remoción de H_2O_2 [101]. En suma, en pacientes pediátricos con sepsis se observa una disminución de las defensas

antioxidantes enzimáticas eritrocitarias, cuya relevancia *in vivo* es incierta. Sin embargo, en conjunto con la disminución del índice tiólico, define un aumento del estado pro-oxidante en el eritrocito. Luego de la producción hepática, el eritrocito es la principal fuente de GSH en el organismo, originando hasta un 10% del GSH corporal total [102]. El daño oxidativo en el eritrocito puede condicionar alteraciones de su deformabilidad, envejecimiento prematuro y menor capacidad transportadora de oxígeno [103,104], lo cual es aún más relevante en condiciones de hipoperfusión. Adicionalmente, el eritrocito tiene la capacidad de proteger del daño oxidativo a otros tejidos, como endotelio [105] y pulmón [106], por lo que la menor capacidad de respuesta eritrocitaria a la injuria oxidativa puede generar estrés oxidativo a nivel tisular.

En relación al daño oxidativo, se observó un aumento de lipoperoxidación plasmática en los pacientes con sepsis en relación a controles. El estudio realizado por Cherian *et al* [67] no había encontrado diferencias en lipoperoxidación, medida como TBARs en eritrocitos, entre pacientes con sepsis y controles. El hallazgo descrito establece que probablemente el resultado final de las alteraciones previamente descritas en pacientes con sepsis es un desbalance prooxidante-antioxidante, a favor del primero, que tiene como consecuencia un aumento del daño oxidativo a nivel de lípidos. Sin embargo, su interpretación debe ser realizada con cautela ya que la liberación de ácidos grasos producto de destrucción celular facilita su oxidación, lo que también contribuirá a un aumento de los niveles de marcadores de lipoperoxidación [9]. No se encontraron diferencias en relación a la concentración de carbonilos proteicos en plasma. Esto podría deberse a que el *n* de los pacientes sépticos en esta técnica fue menor (*n* = 20), debido a un retraso de su implementación, y es bastante inferior al tamaño muestral calculado para encontrar diferencias en estos dos grupos para este biomarcador (*n* = 90). Es necesario repetir este ensayo en un mayor número de pacientes para definir si en la sepsis pediátrica existe un aumento de daño oxidativo proteico.

Biomarcadores de estrés oxidativo según gravedad y características clínicas de la infección. La evaluación del comportamiento de los biomarcadores de estrés oxidativo según la evolución clínica de los pacientes con sepsis se hizo en primer lugar comparando a casos de pacientes con sepsis no grave y sepsis grave. Esta clasificación es ampliamente aceptada en la literatura pues establece dos grupos bien diferenciados en cuanto a gravedad clínica, lo que se refleja en nuestra muestra en un mayor score PELOD, mayores días de estadía y mayor duración del requerimiento de VMI y DVA, definiendo además una mayor probabilidad de muerte en los casos de sepsis grave. La muerte es un evento poco frecuente en la población pediátrica con sepsis por lo que se utilizó como *outcome* alternativo la probabilidad de muerte según score PELOD, que cuantifica la ocurrencia de SDOM y ha sido validado como un predictor de muerte en niños [69-71]. Adicionalmente, se consideró que un mayor requerimiento vasoactivo implicaría una mayor gravedad clínica, por lo que se clasificó a los pacientes sépticos en aquéllos que requirieron 0-2 DVA y los que requirieron 3 o más DVA. Se utilizaron también variables continuas de estimación de gravedad clínica usualmente utilizadas: duración de la hospitalización en UPCP y hospitalización total, duración del requerimiento de VMI y duración del requerimiento de DVA.

En el caso de los biomarcadores de defensa antioxidante no enzimática, no se observaron cambios en los valores de FRAP al clasificar según sepsis no grave y sepsis grave. Sin embargo, se observó un mayor nivel de FRAP en los pacientes con probabilidad de morir > 10% en relación a aquéllos con probabilidad < 1% (al día 2 de evolución) y también en los pacientes que requirieron apoyo con 3 o más DVA. En el caso del índice tiólico no se encontraron diferencias según la gravedad al clasificar en sepsis no grave y sepsis grave. Tampoco se observaron diferencias en el índice tiólico según las otras estimaciones utilizadas de gravedad. El aumento de la capacidad antioxidante plasmática parece ser paradójico en el contexto de la fisiopatología de la sepsis, como fue discutido previamente, pero podría reflejar una mayor tasa de hemólisis en pacientes con cuadros más graves.

Sin embargo, estos resultados son concordantes con trabajos previos que refieren valores más altos de capacidad antioxidante en suero o plasma en pacientes que no sobreviven [90] y en pacientes adultos con sepsis que evolucionan con shock [89].

En el caso de los mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos, se observó una menor actividad de CAT en los pacientes con sepsis grave en relación a los pacientes con sepsis no grave, lo que podría explicarse en contexto de mayor daño oxidativo de proteínas, y un mayor ambiente prooxidante eritrocitario, como fue previamente comentado. También se observó una disminución de CAT en pacientes con mayor probabilidad de morir. En el único estudio publicado sobre evaluación de actividad enzimática antioxidante eritrocitaria según gravedad de la sepsis, se reportó una disminución de actividad de CAT en no sobrevivientes [107]. No se observaron diferencias en otras actividades enzimáticas según clasificación por probabilidad de morir y requerimiento de DVA.

En el caso de los biomarcadores de daño oxidativo se observó una mayor concentración plasmática de F_2 -isoprostanos en los pacientes con probabilidad de morir > 10% en relación a los con probabilidad < 1% (al día 2). No se encontraron diferencias en relación a la concentración plasmática de carbonilos. Sin embargo, en todas las clasificaciones según gravedad se observa una tendencia hacia el aumento de F_2 -isoprostanos, que no alcanza significancia estadística.

En el caso de NF- κ B, se observó un aumento de la activación de las subunidades p50 y p65 en pacientes con sepsis grave. El heterodímero p50/p65 es el más abundante en los distintos tipos celulares [108], por lo que su mayor translocación nuclear implicaría un aumento de la transcripción de genes relacionados con actividad inflamatoria. Estos resultados son concordantes con estudios previos que refieren un aumento de la actividad de NF- κ B en pacientes sépticos adultos que no sobreviven [64,65] y en pacientes pediátricos con sepsis grave [68]. Este hallazgo apoya la teoría de que en la sepsis grave infantil, al igual que el población

adulta, existiría un estado de respuesta inflamatoria exacerbada, lo que determina una mayor producción de mediadores inflamatorios y daño tisular, además de disfunción miocárdica y endotelial, contribuyendo a la progresión hacia SDOM [24].

Los análisis realizados según clasificación por gravedad están limitados por la menor cantidad de pacientes en cada subgrupo. El tamaño muestral inicial se calculó para el hallazgo de diferencias entre el grupo control y el grupo de pacientes con sepsis, por lo que las clasificaciones según estimación de gravedad clínica definían grupos con tamaños muestrales limitados. Esto fue aún más marcado en el caso de los carbonilos proteicos, debido a que, como fue comentado previamente, la determinación de este biomarcador se realizó en un menor número de pacientes. Es posible que las tendencias observadas en los niveles de algunos biomarcadores en relación a gravedad definan cambios reales que no están siendo detectados debido a limitación por el tamaño de la muestra. Es necesario realizar estos ensayos en un mayor número de pacientes.

En el análisis de indicadores continuos de gravedad no se encontró correlación con ninguno de los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados. El análisis del subgrupo de pacientes con sepsis grave mostró una correlación positiva discreta entre todos estos indicadores (duración hospitalización en UPCP, duración total de hospitalización, duración del requerimiento de VMI y duración del requerimiento de DVA) y la actividad de SOD al día 1 de hospitalización. Esto parece estar en contradicción con el hecho de que los pacientes sépticos mostraran menor actividad de SOD en relación a controles. No es esperable que estos pacientes presenten mayor producción de SOD en eritrocito frente a un aumento del ambiente prooxidante. Sin embargo, es posible que el tiempo de evolución del cuadro infeccioso haya sido más prolongado, permitiendo una mayor producción de SOD en eritrocitos y reticulocitos en formación *de novo*. Se evaluó esta posibilidad buscando una asociación de SOD con los días de evolución clínica del cuadro, sin encontrarse correlación. Sin embargo, este dato clínico fue subjetivo

en la anamnesis al momento del seguimiento de los pacientes, por lo que este análisis requiere mayor estudio y precisión. Es posible que los pacientes con evoluciones más graves presenten un recambio mayor de eritrocitos, lo que permitiría una respuesta adaptativa genómica, o que estas mediciones estén reflejando un mayor requerimiento de transfusiones de glóbulos rojos, lo que no fue explorado. Otra posibilidad es la presencia de modificaciones post-traduccionales de SOD, sin embargo, la mayoría de las modificaciones post-traduccionales descritas hasta la fecha resultan en una disminución de la actividad de esta enzima [109].

El análisis del comportamiento de los biomarcadores evaluados según el tipo de infección, por bacterias gram positivas o gram negativas, y según la presencia de bacteriemia, no mostró diferencias estadísticamente significativas. El tipo de infección y el aislamiento del patógeno en sangre no parecen modificar el comportamiento de los biomarcadores de estrés oxidativo.

Comportamiento de los biomarcadores de estrés oxidativo durante la evolución clínica. Se realizó un análisis temporal del comportamiento de los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados hasta el día 5 de evolución en UPCP. No se encontraron cambios en los biomarcadores durante este período en el grupo de pacientes con sepsis y tampoco al clasificar a los pacientes según cuadro de sepsis no grave o sepsis grave. Previamente se ha reportado que pacientes adultos con shock séptico presentan un aumento del índice GSSG/GSH, que tiende a normalizarse hacia la tercera semana de evolución [66]. Otro estudio en pacientes adultos [91] no mostró diferencias en la capacidad antioxidante plasmática entre sujetos sanos, pacientes con sepsis grave y pacientes con shock séptico, pero en estos 3 grupos este marcador presentaba una disminución hasta el día 10 de evolución, asociado a una disminución de la concentración de vitamina C y un aumento progresivo de la concentración plasmática de vitamina A y vitamina E. En el estudio publicado por Andresen *et al* [47] se observaron niveles menores de vitamina C y GSH, además de niveles más altos de TBARs,

carbonilos proteicos y GSSG a los 0, 1, 3 y 7 días de seguimiento, en pacientes con shock séptico en relación a controles. Si bien en este trabajo no se encontraron diferencias entre estos tiempos de evolución, el seguimiento a los tres meses mostró normalización de todos los biomarcadores, con la excepción de carbonilos proteicos que persistían elevados aunque en menor magnitud. Es esperable que los pacientes que sobreviven al cuadro séptico (la gran mayoría en nuestra serie) presenten una tendencia a la normalización progresiva de los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo. Sin embargo, estos cambios ocurren, al menos en la población adulta, en márgenes de tiempo mayores al seguimiento de 5 días que se llevó a cabo, lo que puede explicar la ausencia de cambios en el período analizado. Adicionalmente, el seguimiento realizado tiene un sesgo de selección ya que los días finales del seguimiento sólo incluían los pacientes que permanecían hospitalizados en UPCP, los cuales teóricamente correspondían a pacientes de evolución más grave. En consecuencia, para aclarar este punto es necesario realizar un seguimiento de la evolución de estos biomarcadores en todos los pacientes por un tiempo mayor e idealmente buscar asociación entre estos biomarcadores y scores de seguimiento de gravedad clínica validados en sepsis pediátrica, los que no están disponibles hasta la fecha. Una dificultad de este tipo de estudio radica en la toma de muestra cuando el paciente ya no tiene catéter arterial, lo que implica una punción adicional y que probablemente dificultaría el consentimiento a la realización del estudio. Para este tipo de seguimiento sería ideal utilizar biomarcadores en muestras de toma menos invasiva, como orina.

Utilidad de los biomarcadores como predictores de evolución clínica. Análisis multivariantes no lograron definir biomarcadores con utilidad pronóstica en sepsis pediátrica. Se estimó la gravedad de acuerdo a la evolución hacia sepsis grave, al score PELOD y a indicadores continuos de gravedad de evolución. Es posible que estos resultados estén limitados por la escasez de pacientes con evoluciones más graves. Según estos resultados, los biomarcadores evaluados no tienen utilidad como predictores de evolución en esta patología.

Limitaciones del estudio. El presente trabajo se realizó en una población de pacientes sin patología previa. De esta manera, los resultados obtenidos no son aplicables a pacientes pediátricos con condiciones nutricionales o metabólicas crónicas, los cuales pueden presentar alteraciones preexistentes en los mecanismos de defensa antioxidante que establezcan una menor capacidad de responder a una injuria oxidativa [110], como es la sepsis. Por otra parte, no se incluyeron en este estudio los pacientes con diagnóstico de sepsis que no ingresaron a UPCP. El grupo estudio correspondía a pacientes que por el hecho de ingresar a UPCP ya estaban seleccionados por gravedad, por lo que la utilidad de los biomarcadores evaluados como predictores de requerimiento de ingreso a UPCP es incierta. La principal limitación para la determinación del comportamiento de los biomarcadores evaluados según la evolución clínica es la escasez de pacientes de gravedad intensa, lo que es probablemente el resultado de la mejoría de las condiciones socioeconómicas y de salud pública en nuestra población, además de la optimización del manejo inicial de la sepsis pediátrica. Adicionalmente, el tamaño muestral se calculó sólo para evidenciar diferencias entre el grupo control y el grupo de pacientes con sepsis, por lo que la evaluación de los biomarcadores en relación a los subgrupos gravedad está limitada por el tamaño de la muestra. En relación a la evaluación de mecanismos de defensa antioxidante intracelulares en el eritrocito, esta determinación tiene como limitante el ser realizada en células no nucleadas, incapaces de montar una respuesta genómica adaptativa frente a una injuria oxidativa. De esta manera, los resultados obtenidos no necesariamente son reflejo de lo que ocurre en otros tejidos, en los que podrían activarse mecanismos de respuesta antioxidante, como los relacionados con la activación del factor de transcripción Nrf2.

Proyecciones del estudio. A fin de clarificar la participación del estrés oxidativo en la progresión de los cuadros de sepsis grave infantil es necesario explorar el comportamiento de estos y otros biomarcadores en una población pediátrica con mayor frecuencia de cuadros sépticos de gravedad intensa, o la aplicación de

estudios multicéntricos. Al haberse ya demostrado cambios en biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes pediátricos con sepsis, la futura evaluación de estos y otros biomarcadores en relación a la gravedad de la evolución clínica debiera incluir pacientes con patología y déficits nutricionales previos, asociado a la evaluación del tiempo de evolución del cuadro antes del inicio del manejo. Este tipo de pacientes usualmente presentan una evolución hacia un estado de mayor gravedad, con mayor mortalidad [2], y teóricamente presentarían de manera basal una menor capacidad de respuesta a la injuria oxidativa. La disfunción mitocondrial es otro aspecto de interés a evaluar en estos pacientes en futuros estudios. Los resultados del presente trabajo no permiten sustentar en esta población el uso de terapias de refuerzo antioxidante en la sepsis pediátrica, pero su evaluación aún debe ser atendida.

8. Conclusiones

1) Los pacientes pediátricos menores a 7 años sin patología aguda ni sistémica crónica:

- Presentan una disminución de la capacidad antioxidante plasmática con la edad.
- Presentan un aumento de la actividad de SOD eritrocitaria con la edad.
- No presentan diferencias de biomarcadores de estrés oxidativo en relación a género.

2) En los pacientes pediátricos menores a 7 años con diagnóstico de sepsis es posible observar cambios en parámetros asociados a estrés oxidativo, lo que se refleja en:

- Niveles elevados de lipoperoxidación en plasma pese a un aumento de la capacidad antioxidante plasmática.
- Una disminución de la defensa antioxidante eritrocitaria dado por una menor actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT, pese a un aumento de la GSHPx.
- Una disminución del índice tiólico eritrocitario, lo que condiciona una menor defensa antioxidante enzimática y no enzimática dependiente de GSH.

3) Los cuadros de sepsis de evolución más grave se asocian a cambios en biomarcadores de estrés oxidativo y actividad inflamatoria, manifestándose como:

- Menor actividad enzimática de CAT
- Aumento de la capacidad antioxidante plasmática
- Aumento de la actividad de SOD en el subgrupo de sepsis grave
- Aumento de lipoperoxidación plasmática
- Aumento de la activación de factor nuclear NF- κ B

4) Los biomarcadores evaluados no tienen utilidad como predictores de evolución clínica en la sepsis pediátrica.

9. Referencias

1. Angus DC; Linde-Zwirble WT; Lidicker J; Clermont G; Carcillo J and Pinsky MR. "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care". *Crit Care Med.* 29:1303-1310, 2001.
2. Bryce J; Boschi-Pinto C; Shibuya K; Black RE and WHO Child Health Epidemiology Reference Group. "WHO estimates of the causes of death in children". *Lancet.* 365:1147–1152, 2005.
3. Watson RS and Carcillo JA. "Scope and epidemiology of pediatric sepsis". *Pediatr Crit Care Med.* 6:S3–S5, 2005.
4. Inwald DP; Tasker RC; Peters MJ; Nadel S; on behalf of the Paediatric Intensive Care Society Study Group (PICS-SG). "Emergency management of children with severe sepsis in the United Kingdom: the results of the Paediatric Intensive Care Society sepsis audit". *Arch Dis Child.* 94:348–353, 2009.
5. Goldstein B; Giroir B and Randolph A. "International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics". *Pediatr Crit Care Med.* 6:2–8, 2005.
6. Levy MM; Fink MP; Marshall JC; Abraham E; Angus D; Cook D; Cohen J; Opal SM; Vincent JL; and Ramsay G. "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference". *Crit Care Med.* 31:1250–1256, 2003.
7. Lacroix J and Cotting J. "Severity of illness and organ dysfunction scoring in children". *Pediatr Crit Care Med.* 6:S126–S134, 2005.
8. Brierley J; Carcillo JA *et al.* "Clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal septic shock: 2007 update from the American College of Critical Care Medicine". *Crit Care Med.* 37:666-688, 2007.
9. Kehrer JP. "Free radicals as mediators of tissue injury and disease". *Crit Rev Toxicol.* 23:21–48, 1993.
10. Riley PA. "Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation". *Int J Radiat Biol.* 65:27–33, 1994.
11. Toro J and Rodrigo R. "Oxidative Stress: Basic Overview". In: *Oxidative stress and antioxidants: their role in human disease.* Edited by Rodrigo R. New York: Nova Science Publishers; 2009. pp. 1-24.
12. Esterbauer H; Schaur RJ and Zollner H. "Chemistry and biochemistry of 4-

- hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes". *Free Radic Biol Med.* 11:81–128, 1991.
13. Stadtman ER. "Role of oxidant species in aging". *Curr Med Chem.* 11:1105–1112, 2004.
 14. Fariss MW; Chan CB; Patel M; Van Houten B and Orrenius S. "Role of mitochondria in toxic oxidative stress". *Mol Interv.* 5:94–111, 2005.
 15. Sies H. "Biochemistry of Oxidative Stress". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25:1058–1071, 1986.
 16. Cinel I and Dellinger RP. "Advances in pathogenesis and management of sepsis". *Curr Opin Infect Dis.* 20:345–352, 2007.
 17. Hotchkiss RS and Karl IE. "The pathophysiology and treatment of sepsis". *N Engl J Med.* 348:138–150, 2003.
 18. Creagh EM and O'Neill LAJ. "TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity". *Trends Immunol.* 27:352–357, 2006.
 19. Cohen J. "The immunopathogenesis of sepsis". *Nature.* 420:885–891, 2002.
 20. Vasselon T and Detmers PA. "Toll receptors: a central element in innate immune responses". *Infect Immun.* 70:1033–1041, 2002.
 21. Jaeschke H. "Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts". *J Gastroenterol Hepatol.* 26 Suppl 1:173–179, 2011.
 22. Piccinini AM and Midwood KS. "DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling". *Mediators Inflamm.* 2010:1–21, 2010.
 23. Hayden MS and Ghosh S. "NF- κ B in immunobiology". *Cell Res.* 21:223–244, 2011.
 24. Liu SF and Malik AB. "NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290:L622–L645, 2006.
 25. Kawai T and Akira S. "Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors". *Trends Mol Med.* 13:460–469, 2007.
 26. Ea C-K; Deng L; Xia Z-P; Pineda G and Chen ZJ. "Activation of IKK by TNF α Requires Site-Specific Ubiquitination of RIP1 and Polyubiquitin Binding by NEMO". *Mol Cell.* 22:245–257, 2006.

27. Gloire G and Piette J. "Redox Regulation of Nuclear Post-Translational Modifications During NF-kappaB Activation". *Antioxid Redox Signal*. 11:2209–2222, 2009.
28. Fialkow L; Wang Y and Downey GP. "Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function". *Free Radic Biol Med*. 42:153–164, 2007.
29. Gogos CA; Drosou E; Bassaris HP and Skoutelis A. "Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options". *J Infect Dis*. 181:176–180, 2000.
30. Andresen M; Regueira T and Leighton F. "Estrés oxidativo en el paciente crítico". *Rev Med Chil*. 134:649-656, 2006.
31. Víctor VM; Espulgues JV; Hernández-Mijares A and Rocha M. "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants". *Infect Disord Drug Targets*. 9:376–389, 2009.
32. Faure E; Thomas L; Xu H; Medvedev A; Equils O and Arditi M. "Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation". *J Immunol*. 166:2018–2024, 2001.
33. Peters K; Unger RE; Brunner J and Kirkpatrick CJ. "Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis". *Cardiovasc Res*. 60:49–57, 2003.
34. Dellinger RP. "Inflammation and coagulation: implications for the septic patient". *Clin Infect Dis*. 36:1259–1265, 2003.
35. Kirkebøen KA and Strand OA. "The role of nitric oxide in sepsis—an overview". *Acta Anaesthesiol Scand*. 43:275–288, 1999.
36. Andresen M and Regueira T. "Myocardial dysfunction in sepsis". *Rev Med Chil*. 138:888–896, 2010.
37. Rudiger A and Singer M. "Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction". *Crit Care Med*. 35:1599–1608, 2007.
38. Levy RJ; Vijayasarathy C; Raj NR; Avadhani NG and Deutschman CS. "Competitive and Noncompetitive Inhibition of Myocardial Cytochrome C Oxidase in Sepsis". *Shock*. 21:110–1142, 2004.
39. von Dessauer B; Bongain J; Molina V; Quilodrán J; Castillo R and Rodrigo R. "Oxidative stress as a novel target in pediatric sepsis management". *J Crit Care*. 26:103.e1–7, 2011.

40. Fink MP. "Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia". *Crit Care*. 6:491–499, 2002.
41. Crouser ED; Julian MW; Huff JE; Joshi MS; Bauer JA; Gadd ME; Wewers MD and Pfeiffer DR. "Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia". *Crit Care Med*. 32:478–488, 2004.
42. Singer M. "Mitochondrial function in sepsis: Acute phase versus multiple organ failure". *Crit Care Med*. 35:S441–S448, 2007.
43. Galley HF. "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis". *Br J Anaesth*. 107:57–64, 2011.
44. Committee on Biological Markers of the National Research Council. "Biological markers in environmental health research". *Environ. Health Perspect*. 74:3–9, 1987
45. Tsai K; Hsu T; Kong C; Lin K and Lu F. "Is the endogenous peroxy-radical scavenging capacity of plasma protective in systemic inflammatory disorders in humans?" *Free Radic Biol Med*. 28:926–933, 2000.
46. Alonso de Vega JM; Díaz J; Serrano E and Carbonell LF. "Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome". *Crit Care Med*. 30:1782–1786, 2002.
47. Andresen M; Regueira T; Bruhn A; Perez D; Strobel P; Dognac A; Marshall G and Leighton F. "Lipoperoxidation and protein oxidative damage exhibit different kinetics during septic shock". *Mediators Inflamm*. 2008:168652, 2008.
48. Salvemini D and Cuzzocrea S. "Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation". *Free Radic Biol Med*. 33:1173–1185, 2002.
49. Strand OA; Leone A; Giercksky KE and Kirkebøen KA. "Nitric oxide indices in human septic shock". *Crit Care Med*. 28:2779–2785, 2000.
50. Durant R; Klouche K; Delbosc S; Morena M; Amigues L; Beraud JJ; Canaud B and Cristol JP. "Superoxide anion overproduction in sepsis: effects of vitamin e and simvastatin". *Shock*. 22:34–39, 2004.
51. Weber SU; Lehmann LE; Schewe J-C; Thiele JT; Schröder S; Book M; Hoefft A and Stüber F. "Low serum alpha-tocopherol and selenium are associated with accelerated apoptosis in severe sepsis". *BioFactors*. 33:107–119, 2008.

52. Ribeiro Nogueira C; Ramalho A; Lameu E; Da Silva Franca CA; David C and Accioly E. "Serum concentrations of vitamin A and oxidative stress in critically ill patients with sepsis". *Nutr Hosp.* 24:312–317, 2009.
53. Goode HF; Cowley HC; Walker BE; Howdle PD and Webster NR. "Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction". *Crit Care Med.* 23:646–651, 1995.
54. Cowley HC; Bacon PJ; Goode HF; Webster NR; Jones JG and Menon DK. "Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors". *Crit Care Med.* 24:1179–1183, 1996.
55. Motoyama T; Okamoto K; Kukita I; Hamaguchi M; Kinoshita Y and Ogawa H. "Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome". *Crit Care Med.* 31:1048–1052, 2003.
56. Ware LB; Fessel JP; May AK and Roberts LJ II. "Plasma Biomarkers of Oxidant Stress and Development of Organ Failure in Severe Sepsis". *Shock.* 36:12–17, 2011.
57. Ogilvie AC; Groeneveld AB; Straub JP and Thijs LG. "Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock". *Intensive Care Med.* 17:40–44, 1991.
58. Ohya M; Marukawa S; Inoue T; Ueno N; Hosohara K; Terada N and Kosaka H. "Plasma nitrotyrosine concentration relates to prognosis in human septic shock". *Shock.* 18:116–118, 2002.
59. Luchtemberg MN; Petronilho F; Constantino L; Gelain DP; Andrades M; Ritter C; Moreira JC; Streck EL and Dal-Pizzol F. "Xanthine oxidase activity in patients with sepsis". *Clin Biochem.* 41:1186–1190, 2008.
60. Galley HF; Davies MJ and Webster NR. "Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome". *Crit Care Med.* 24:1649–1653, 1996.
61. Horton JW. "Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy". *Toxicology.* 189:75–88, 2003.
62. Cheng WE; Shih CM; Hang LW; Wu KY; Yang HL; Hsu WH and Hsia TC. "Urinary biomarker of oxidative stress correlating with outcome in critically septic patients". *Intensive Care Med.* 33:1468–1472, 2007.
63. Paterson RL; Galley HF; Dhillon JK and Webster NR. "Increased nuclear factor kappa B activation in critically ill patients who die". *Crit Care Med.* 28:1047–1051, 2000.

64. Böhler 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 and Nawroth PP. "Role of NFkappaB in the mortality of sepsis". *J Clin Invest.* 100:972–985, 1997.
65. Arnalich F; Garcia-Palomero E; López J; Jiménez M; Madero R; Renart J; Vázquez JJ and Montiel C. "Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis". *Infect Immun.* 68:1942-1945, 2000.
66. Németh I and Boda D. "Xanthine oxidase activity and blood glutathione redox ratio in infants and children with septic shock syndrome". *Intensive Care Med.* 27:216–221, 2001.
67. Cherian S; Jameson S; Rajarajeswari C; Helena V; Latha L; Anu Rekha MR; Nagamma T; Subba Raju V; Kini PG and Rao A. "Oxidative stress in sepsis in children". *Indian J Med Res.* 125:143–148, 2007.
68. Hotta N; Ichiyama T; Shiraishi M; Takekawa T; Matsubara T and Furukawa S. "Nuclear factor-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells in children with sepsis". *Crit Care Med.* 35:2395–2401, 2007.
69. Leteurtre S; Martinot A; Duhamel A; Proulx F; Grandbastien B; Cotting J; Gottesman R; Joffe A; Pfenninger J; Hubert P; Lacroix J and Leclerc F. "Validation of the paediatric logistic organ dysfunction (PELOD) score: prospective, observational, multicentre study". *Lancet.* 362:192–197, 2003.
70. Leteurtre S; Duhamel A; Grandbastien B; Lacroix J and Leclerc F. "Paediatric logistic organ dysfunction (PELOD) score". *Lancet.* 367:897–897, 2006.
71. Leclerc F; Leteurtre S; Duhamel A; Grandbastien B; Proulx F; Martinot A; Gauvin F; Hubert P and Lacroix J. "Cumulative Influence of Organ Dysfunctions and Septic State on Mortality of Critically Ill Children". *Am J Respir Crit Care Med.* 171:348–353, 2005.
72. Benzie IF and Strain JJ. "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay". *Anal Biochem.* 239:70–76, 1996.
73. Fossati P; Prencipe L and 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.* 26:227–231, 1980.
74. Hissin PJ and Hilf R. "A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues". *Anal Biochem.* 74:214–226, 1976.

75. Misra HP and Fridovich I. "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase". *J Biol Chem.* 247:3170–3175, 1972.
76. Aebi, H. Catalase, *Methods in Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U, ed.), pp. 673–677, Academic Press, New York, 1974.
77. Flohé L and Günzler WA. "Assays of glutathione peroxidase". *Methods Enzymol.* 105:114–121, 1984.
78. Ritter C; Andrades M; Frota Júnior ML; Bonatto F; Pinho RA; Polydoro M; Klamt F; Pinheiro CT; Menna-Barreto SS; Moreira JC and Dal-Pizzol F. "Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation". *Intensive Care Med.* 29:1782–1789, 2003.
79. Guerreiro MO; Petronilho F; Andrades M; Constantino L; Mina FG; Moreira JC; Dal-Pizzol F and Ritter C. "Plasma Superoxide Dismutase Activity and Mortality in septic patients". *J Trauma.* 69:E102–E106, 2010.
80. 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 and Castillo L. "Cysteine metabolism and whole blood glutathione synthesis in septic pediatric patients". *Crit Care Med.* 29:870–877, 2001.
81. Nassi N; Ponziani V; Becatti M; Galvan P and Donzelli G. "Anti-oxidant enzymes and related elements in term and preterm newborns". *Pediatr Int.* 51:183–187, 2009.
82. Loui A; Raab A; Maier RF; Brätter P and Obladen M. "Trace elements and antioxidant enzymes in extremely low birthweight infants". *J Trace Elem Med Biol.* 24:111–118, 2010.
83. Davis JM and Auten RL. "Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth". *Semin Fetal Neonatal Med.* 15:191–195, 2010.
84. Weston EJ; Pondo T; Lewis MM; Martell-Cleary P; Morin C; Jewell B; Daily P; Apostol M; Petit S; Farley M; Lynfield R; Reingold A; Hansen NI; Stoll BJ; Shane AL; Zell E and Schrag SJ. "The Burden of Invasive Early-onset Neonatal Sepsis in the United States, 2005–2008". *Pediatr Infect Dis J.* 30:937–941, 2011.
85. Balamuth F; Weiss SL; Neuman MI; Scott H; Brady PW; Paul R; Farris RW; McClead R; Hayes K; Gaieski D; Hall M; Shah SS and Alpern ER. "Pediatric Severe Sepsis in U.S. Children's Hospitals". *Pediatr Crit Care Med* 2014, Aug 26 [Epub ahead of print].
86. Gitto E; Pellegrino S; Gitto P; Barberi I and Reiter RJ. "Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of

- melatonin". *J Pineal Res.* 46:128–139, 2009.
87. Watanabe K; Shibuya S; Ozawa Y; Nojiri H; Izuo N; Yokote K and Shimizu T. "Superoxide Dismutase 1 Loss Disturbs Intracellular Redox Signaling, Resulting in Global Age-Related Pathological Changes". 2014: 140165, 2014.
 88. Almeida M. "Aging mechanisms in bone". *BoneKEy Reports* 1, Article number: 102 (2012).
 89. Pascual C; Karzai W; Meier-Hellmann A; Oberhoffer M; Horn A; Bredle D and Reinhart K. "Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis". *Crit Care Med.* 26:705–709, 1998.
 90. Chuang CC; Shiesh SC; Chi CH; Tu YF; Hor L; Shieh CC and Chen MF. "Serum total antioxidant capacity reflects severity of illness in patients with severe sepsis". *Crit Care.* 10:R36, 2006.
 91. Doise JM; Aho LS; Quenot JP; Guillaud JC; Zeller M; Vergely C; Aube H; Blettery B and Rochette L. "Plasma antioxidant status in septic critically ill patients: a decrease over time". *Fundam Clin Pharmacol.* 22:203–209, 2008.
 92. Margaron MP and Soni NC. "Effects of albumin supplementation on microvascular permeability in septic patients". *J Appl Physiol.* 92:2139–2145, 2002.
 93. Vázquez-Armenta G; González-Leal N; J Vázquez-de la Torre M; Muñoz-Valle JF; Ramos-Márquez ME; Hernández-Cañaveral I; Plascencia-Hernández A and Siller-López F. "Short (GT)_n Microsatellite Repeats in the Heme Oxygenase-1 Gene Promoter Are Associated with Antioxidant and Anti-Inflammatory Status in Mexican Pediatric Patients with Sepsis". *Tohoku J Exp Med.* 231:201–209, 2013.
 94. Paffetti P; Perrone S; Longini M; Ferrari A; Tanganelli D; Marzocchi B and Buonocore G. "Non-protein-bound iron detection in small samples of biological fluids and tissues". *Biol Trace Elem Res.* 112:221–232, 2006.
 95. Delaporta P; Kattamis A; Apostolakou F; Boiu S; Bartzeliotou A; Tsoukas E and Papassotiriou I. "Correlation of NT-proBNP levels and cardiac iron concentration in patients with transfusion-dependent thalassemia major". 50:20–24, 2013.
 96. Zhou S; Sun W; Zhang Z and Zheng Y. "The Role of Nrf2-Mediated Pathway in Cardiac Remodeling and Heart Failure". 2014: 260429, 2014.
 97. Salo DC; Pacifici RE; Lin SW; Giulivi C and Davies KJ. "Superoxide

- dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation". *J Biol Chem.* 265:11919–11927, 1990.
98. Kim SY; Kwon OJ and Park JW. "Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye". *Biochimie* 83:437–444, 2001.
 99. Kono Y and Fridovich I. "Superoxide radical inhibits catalase". *J Biol Chem.* 257:5751-5754, 1982.
 100. Baker RD; Baker SS; LaRosa K; Whitney C and Newburger PE. "Selenium regulation of glutathione peroxidase in human hepatoma cell line Hep3B". *Arch Biochem Biophys.* 304:53–57, 1993.
 101. Pannala VR; Bazil JN; Camara AKS and Dash RK. "A mechanistic mathematical model for the catalytic action of glutathione peroxidase". *Free Radic Res.* 48:487–502, 2014.
 102. Lyons J; Rauh-Pfeiffer A; Yu YM; Lu XM; Zurakowski D; Tompkins RG; Ajami AM; Young VR and Castillo L. "Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet". *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97:5071–5076, 2000.
 103. Rifkind JM and Nagababu E. "Hemoglobin Redox Reactions and Red Blood Cell Aging". *Antioxid Redox Signal.* 18:2274–2283, 2013.
 104. Mohanty JG; Nagababu E and Rifkind JM. "Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging". 5:84, 2014.
 105. Richards RS; Roberts TK; Dunstan RH; McGregor NR and Butt HL. "Erythrocyte antioxidant systems protect cultured endothelial cells against oxidant damage". *Biochem Mol Biol Int.* 46:857–865, 1998.
 106. Heffner JE and Repine JE. "Pulmonary strategies of antioxidant defense". *Am Rev Respir Dis.* 140:531–554, 1989.
 107. Karapetsa M; Pitsika M; Goutzourelas N; Stagos D; Tousia Becker A and Zakyntinos E. "Oxidative status in ICU patients with septic shock". 61:106–111, 2013.
 108. Siebenlist U; Franzoso G and Brown K. "Structure, regulation and function of NF-kappa B". *Annu Rev Cell Biol.* 10:405–455, 1994.
 109. Yamakura F and Kawasaki H. "Post-translational modifications of superoxide dismutase". *Biochim Biophys Acta.* 1804:318–325, 2010.
 110. Khare M; Mohanty C; Das BK; Jyoti A; Mukhopadhyay B; and Mishra SP. "Free radicals and antioxidant status in protein energy malnutrition". *Int J Pediatr.* 2014:254396, 2014.

ANEXO 1 (1/2)



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

1/2



ACTA DE APROBACIÓN 14 JUL. 2011 PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS

Con fecha 12 de julio de 2011, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente
Sra. Marianne Gaudlitz H., Enfermera, Mg. Humanidades, Vicepresidente
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública
Dr. Leandro Biagini A., Médico Internista
Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista
Sra. Nina Horwitz C., Sociólogo, Mg. Bioética
Dra. María Eugenia Pinto C., Médico Infectólogo
Sra. Claudia Marshall F., Representante de la comunidad

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"Improvement of pediatric sepsis management through the reinforcement of the antioxidant system"** y cuyo investigador responsable es la **Dra. Emilia Sanhueza R.**, quien desempeña funciones en el **Programa Disciplinario de Fisiopatología Campus Norte, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.**

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- *Proyecto de investigación in extenso*
- *Consentimiento informado*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl

ANEXO 1 (2/2)



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

2/2



Sobre la base de esta información el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) Carácter de la población estudiada: Se trata de una investigación terapéutica.
- b) Utilidad del Proyecto: Proyecto con interesante aporte al manejo de la sepsis en el niño.
- c) Riesgos y Beneficios: Beneficios terapéuticos a evaluar. El riesgo de administración de antioxidante esta controlado por ser dosis subtóxicas
- d) Protección de los participantes: Consentimiento Informado adecuado para cada uno de los tres grupos.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: Esta considerado e implica la suspensión del tratamiento.
- f) La investigadora responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto.

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión original del 17 de junio de 2011, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por el CEISH.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Santiago, 13 de julio de 2011.



Sra. **Marianne Gauditz H.**
Vicepresidenta
Comité de Ética en Investigación
en Seres Humanos

MGH/mva.
c.c.: Archivo Proy. 063-2011

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl

ANEXO 2

Servicio de Salud Metropolitano Norte
UPC Hospital Roberto del Río
Universidad de Chile

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Grupo control

Título del proyecto: “Participación del estrés oxidativo en la evolución clínica de pacientes pediátricos con sepsis”

Objetivos: Esta investigación tiene por objetivo estudiar si a través de algunos exámenes de laboratorio se puede saber antes cuál niño/a va a evolucionar más grave, lo que nos ayudaría también a buscar nuevos tratamientos para estos cuadros. Para esto se necesita estudiar a niños con infecciones graves y a niños sanos (grupo control).

Procedimientos: Si usted acepta participar, a su hijo se le extraerá una muestra de 4 mL de sangre al momento de la instalación de la vía venosa en pabellón. La instalación de la vía venosa es un procedimiento necesario y de rutina en la anestesia para las cirugías, realizándose en general luego de iniciada la anestesia, por lo que no se asocia a dolor. De esta manera, la toma de esta muestra no implica otras punciones o dolor en el paciente.

Riesgos: La extracción de sangre venosa para la toma de exámenes es un procedimiento de rutina que no se asocia a complicaciones relevantes.

Costos: Los costos de la extracción y procesamiento de la muestra son del grupo de investigación.

Confidencialidad: Toda la información derivada de su participación en este estudio será manejada confidencialmente. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

Beneficios: Su participación no se asociará a beneficios directos para su hijo. Los resultados de este estudio beneficiarán en el futuro a niños que presenten infecciones graves.

Derechos del participante: Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llamar a:

Nombre del Investigador principal: **Dra. Bettina von Dessauer**

Institución: Hospital Roberto del Río, / Universidad de Chile. Teléfonos: 5758000 - 5758001

Autoridad de la Institución: Director Médico, Dr. Ignacio Hernández 258063

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para que mi hijo/a _____ participe en el proyecto: “participación del estrés oxidativo en la evolución clínica de pacientes pediátricos con sepsis”.

Nombre del madre, padre o tutor legal

Firma

Fecha

Nombre del informante

Firma

Fecha

ANEXO 3 (1/2)

SSMN
UPC Hospital Roberto del Río
Universidad de Chile

CONSENTIMIENTO INFORMADO FASE I: *Grupo sepsis sin antioxidantes*

Título del proyecto

“Mejoría del manejo de sepsis pediátrica reforzando el sistema antioxidante”
(Improvement of pediatric sepsis management through the reinforcement of the antioxidant defense system)

Invitación a participar: Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación debido a que es un tema muy importante para mejorar el pronóstico de las infecciones graves a futuro, a través de nuevos y más precoces posibilidades de diagnóstico y tratamiento.

Objetivos: Esta investigación tiene por objetivo estudiar si a través de algunos exámenes de laboratorio extra se puede saber antes cuál niño/a va a evolucionar más grave.

Procedimientos: Si Ud. acepta participar, a su hijo/a se extraerá una muestra de sangre de 2 ml 1 vez por día por 5 días para exámenes adicionales a los que se hacen de rutina. No se asociará a dolor ya que se extraerá casi siempre por una línea arterial o vía venosa preestablecida para su cuidado habitual.

Su resultado se integrará a la ficha clínica habitual del hospital.

Se hará el máximo esfuerzo para racionalizar el total de exámenes para compensar estas extracciones.

Riesgos: La extracción de sangre venosa o arterial para examen de laboratorio es un procedimiento de rutina de enfermería, no asociándose habitualmente a complicaciones. Sin embargo en la sumatoria de extracciones necesarias e indispensables, a veces puede llevar al requerimiento de una transfusión para reponer glóbulos rojos o a la pérdida de la vía venosa.

Costos: Los costos de la extracción y procesamiento de la muestra son del grupo de investigación. Su sistema previsional deberá financiar la hospitalización, honorarios, exámenes y tratamientos habituales para el estudio y tratamiento de la enfermedad de su hijo/a.

ANEXO 3 (2/2)

Beneficios: Aparte del beneficio para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, su participación en este estudio no le traerá beneficios tangibles.

Alternativas: Si Ud. decide no participar en esta investigación su hijo/a recibirá la atención y tratamiento habitual.

Confidencialidad: Toda la información derivada de su participación en este estudio será manejada confidencialmente. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

Información adicional: Ud. y el médico tratante de su hijo serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

Voluntariedad: Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.

Derechos del participante: Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llamar a:

Nombre del Investigador principal: Dra. Bettina von Dessauer

Institución: Hospital Roberto del Río, / Universidad de Chile

Teléfonos: 5758000 - 5758001

Autoridad de la Institución: Director Médico, Dr. Ignacio Hernández 258063

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para que mi hijo/a
_____ participe en el proyecto: “-
_____”

Nombre del madre, padre o tutor legal

Firma

Fecha

Nombre del informante

Firma

ANEXO 4 (1/2)

Planilla de seguimiento – Protocolo estrés oxidativo en sepsis

Nombre paciente:	Ficha:	Score PIM2 al ingreso:
-------------------------	---------------	-------------------------------

Criterios que definieron SIRS (Presencia de 2 de los siguientes 4 criterios, uno de los cuales debe ser temperatura anormal o recuento de leucocitos). Valores de referencia en carpeta del protocolo.		
	Sí/No	Valor (si cumple criterio)
Temperatura central > 38,5°C o < 36°C		
Taquicardia: frecuencia cardiaca sobre 2 DE para la edad, en ausencia de estímulos externos (dolor, drogas). En menores de 1 año también es criterio bradicardia menor a percentil 10 en ausencia de beta-bloqueo, cardiopatía congénita o estímulo vagal.		
Taquipnea: frecuencia respiratoria sobre 2 DE para la edad o VM en ausencia de patología muscular o anestesia general		
Recuento de leucocitos aumentado o disminuido para la edad, o inmaduros > 10%.		

Foco infeccioso y fundamento:

Shock séptico	
Sí ___ No ___	Fundamento (en caso de marcar "sí")

Sepsis grave (Presencia de disfunción cardiovascular o distrés respiratorio o 2 o más disfunciones de otros sistemas; ver definición en carpeta del protocolo). Revisar a diario por si cumple criterios.				
Sí ___ No ___				
		Marcar (X) si cumple	Valor (si cumple criterio)	Fecha en que cumple criterio
Cardiovascular Sí ___ No ___	A pesar de uso de solución isotónica 40 ml/kg o más, presencia de (uno): <ul style="list-style-type: none"> · Hipotensión · Uso de vasoactivos · Dos o más de: <ul style="list-style-type: none"> Acidosis metabólica no explicada con BE < -5.0 Ac. Láctico > 2 veces el máximo normal Oliguria < 0.5 ml/kg/hr llene capilar > 5 seg Diferencia T° central /periférica > 3° C 	---	---	---
Respiratorio Sí ___ No ___	Uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> · PaFi < 300 (para distrés respiratorio < 200 + infiltrados bilaterales + aparición aguda + ausencia de falla VI) · PaCO2 > 20 mmHg sobre basal · FIO2 > 50 para SpO2 92% · Necesidad de VMI o VMNI (no por sedación postoperatoria) 	---	---	---
Neurológico Sí ___ No ___	Uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> · Glasgow 11 o menos · Caída aguda de Glasgow de 3 puntos o más desde basal anormal 	---	---	---
Hematológico Sí ___ No ___	Uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> · Recuento plaquetario menor 80.000 o caída a menos de 50% de máximo valor en últimos 3 días (en pacientes hematológicos crónicos) · INR > 2 	---	---	---
Renal Sí ___ No ___	Aumento de creatinemia 2 o más veces el valor normal para edad o del valor basal para el paciente	---	---	---
Hepático Sí ___ No ___	Uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> · Bilirrubina total 4 mg/dL o más (no aplicable en RN) · GPT elevada sobre 2 veces el límite para edad 	---	---	---

Sigue al reverso →

ANEXO 4 (2/2)

Score PELOD (según página de internet disponible en computadores de la unidad)							
		Ingreso	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
	Fecha:						
Score pulmonar							
Score cardiovascular							
Score hepático							
Score neurológico							
Score renal							
Score hematológico							
PELOD score							
Tasa de muerte predicha							

Diagnóstico de egreso (marcar con "X")	
Sepsis	
Shock séptico	
Sepsis grave	
MODS	

AL ALTA ESTA HOJA DEBE QUEDAR ARCHIVADA EN LA CARPETA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Dr. J Quilodrán
Dr V. Molina
Dra. J. Bongain
Dra. B. von Dessauer

Días de evolución:

Días de VMI (días + horas):

Días de NE (días + horas):

Días UCI:

Muerte (Sí/No):

Observaciones: