

Donador exógeno de óxido nítrico en la respuesta inflamatoria hepática y hemodinámica después de choque hemorrágico*

Roberto Anaya-Prado, ** Luis H. Toledo-Pereyra, ***& Ren-Feng Guo, ° Jayne Reuben, ° Peter A. Ward°

Resumen

Introducción: El choque hemorrágico resulta en estrés oxidativo celular e inducción de respuesta inflamatoria. Investigamos la capacidad del nitroprusiato de sodio para reducir la lesión tisular en un modelo animal de choque hemorrágico no controlado.

Material y métodos: 72 ratas Sprague-Dawley distribuidas en cuatro grupos: sham/salina, sham/nitroprusiato de sodio, choque/salina, choque/nitroprusiato de sodio. Se provocó choque hemorrágico (3 ml/100 g) en un periodo de 15 minutos; corte de cola y administración de la droga a los 30 minutos; reanimación hídrica con solución de ringer lactado (RL) para alcanzar presión arterial media (PAM) de 40 mm Hg; una fase de 60 minutos con hemostasia y reanimación hídrica con solución de RL para mantener PAM de 70 mm Hg; y una fase de observación de tres días. El tratamiento al inicio de la reanimación consistió en solución salina o 0.5 mg/kg de nitroprusiato de sodio. Se evaluó requerimiento hídrico para reanimación, función hepática, mieloperoxidasa de tejido hepático, histología hepática y sobrevida.

Resultados: El nitroprusiato de sodio redujo significativamente los requerimientos hídricos para reanimación ($p = 0.0001$) y produjo mejoría en las pruebas de lesión hepática, infiltración neutrófílica evidenciada por mieloperoxidasa de tejido hepático, y estudios histológicos. Se incrementó la sobrevida de 40 % en los controles a 60 % con el nitroprusiato de sodio.

Conclusiones: El exceso de óxido nítrico media la lesión hepática inducida por el choque hemorrágico, y la supresión de óxido nítrico con nitroprusiato de sodio puede reducir las consecuencias patológicas de la hemorragia severa, posiblemente por la eliminación del anión superóxido (O_2^-), limitando la producción de radicales más tóxicos.

Palabras clave: Choque hemorrágico, nitroprusiato de sodio, óxido nítrico.

Summary

Background: Hemorrhagic shock (HS) results in oxidative stress to cells and in the induction of the inflammatory response. We tested the ability of the nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (NP) to reduce tissue injury in a rodent model of uncontrolled hemorrhagic shock.

Methods: Seventy two Sprague Dawley rats weighing 250-300 g were subjected to a model of uncontrolled hemorrhagic shock. Four groups of animals were included ($n = 18$ per group): sham/ saline, sham/NP, shock/saline, shock/NP. Experimental design consisted of the development of hemorrhagic shock (3 ml/100 g) in a 15-min period, tail amputation (75%) and drug administration at 30 min, fluid resuscitation (FR) with lactate Ringer's (LR) solution to reach a mean arterial pressure (MAP) of 40 mmHg, a hospital phase of 60 min with hemostasis and FR with LR solution to reach a MAP of 70 mmHg, and a 3-day observation phase. Treatment at the beginning of resuscitation included either normal saline or sodium nitroprusside (0.5 mg/kg). The following parameters were evaluated: fluid requirements for resuscitation, liver injury tests, liver tissue myeloperoxidase (MPO), liver histology, and 3-day survival.

Results: Sodium nitroprusside significantly reduced fluid requirements for resuscitation ($p = 0.0001$). We also observed an improved statistically significant difference in tests demonstrating hepatic injury ($p = 0.0001$), neutrophil infiltration as evidences by liver MPO ($p < 0.05$), and histology studies ($p = 0.001$). Survival was also increased from 40% in controls to 60% with NP treatment.

Conclusions: These data suggest that excess NO mediates hemorrhage-induced liver injury, and that the suppression of NO with NP may reduce the pathological consequences of severe hemorrhage, possibly by scavenging superoxide (O_2^-), thus limiting the production of more aggressive radicals.

Key words: Hemorrhagic shock, sodium nitroprusside, nitric oxide.

* Trabajo galardonado con el Primer Lugar del Premio al Mérito Científico "Acad. Dr. Gonzalo Castañeda", 2006.

** Dirección de Educación e Investigación en Salud, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Ginecoobstetricia, Centro Médico Nacional de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco.

*** Borgess Research Institute, Trauma, Surgery Research Sciences and Molecular Biology, Kalamazoo, Michigan.

& Departments of Surgery and Research, Michigan State University/Kalamazoo Center for Medical Studies, Kalamazoo, Michigan. Department of Surgery, Michigan State University, East Lansing, Michigan.

° Department of Pathology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan.

Solicitud de sobretiros: Roberto Anaya-Prado, Blvd. Puerta de Hierro 5150, edificio B, segundo piso, despacho 201-B, Frac. Corporativo Zapopan, 45110 Zapopan, Jalisco. Tel. y fax: (33) 3848 5410. E-mail: robana@prodigy.net.mx

Recibido para publicación: 16-08-2007

Aceptado para publicación: 08-10-2007

Introducción

El choque hemorrágico contribuye con la morbilidad y mortalidad a corto y largo plazo después de lesiones traumáticas, sin embargo, los mecanismos específicos involucrados en la fisiopatología de la hemorragia han sido definidos en forma incompleta. El choque hemorrágico resulta en estrés oxidativo de las células y en la inducción de una respuesta inflamatoria, con expresión incrementada de un número de mediadores proinflamatorios y de citocinas.¹⁻⁴

El óxido nítrico ha demostrado que se combina con el superóxido (O_2^-) para formar un radical altamente tóxico, el peroxinitrito, y producir daño oxidativo. También desempeña un papel importante en las señales celulares de transferencia proinflamatorias, alterando la expresión de genes celulares, la actividad enzimática y la activación de factor de transcripción,²⁻⁶ además de regular la vasodilatación, la agregación plaquetaria y neutrofílica, y el flujo sanguíneo orgánico local. Por lo tanto, puede influir de diversas maneras en la función celular y tisular posterior a hemorragia.⁷ El choque hemorrágico disminuye la actividad de la sintasa endotelial constitutiva del óxido nítrico (ecNOS) mientras incrementa la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS).⁸ Investigaciones previas han demostrado que es benéfico proporcionar donadores exógenos de óxido nítrico en las fases tempranas de choque y reanimación, y que es lesivo inhibir la actividad de la ecNOS durante el choque. Algunos autores han demostrado que inhibir la actividad de la sintasa del óxido nítrico (NOS) reduce la lesión orgánica y mejora la sobrevida, sugiriendo que es complejo el papel del óxido nítrico en la fisiopatología del choque hemorrágico. Todo este cuerpo de evidencias apoya la hipótesis de que el óxido nítrico en exceso, generado a partir de la iNOS, promueve la inflamación y lesión tisular.⁹⁻¹¹

Esta hipótesis propone que remover el exceso de ese óxido nítrico en tanto se preserven los niveles basales benéficos del óxido nítrico derivado de la ecNOS, podría mejorar la evolución después de la reanimación del choque hemorrágico. Sin embargo, los problemas con la selectividad de las isoformas de la NOS y las relaciones de la dosis respuesta complican la utilidad terapéutica potencial de los inhibidores de la NOS en los estados de choque. Han sido diseñados algunos compuestos para eliminar (*scavenge*) el óxido nítrico extracelular en exceso.¹²⁻¹⁵ Así, se ha implementado el manejo de donadores exógenos de óxido nítrico. Uno de estos donadores es el *nitroprusiato de sodio*, que ha sido investigado en modelos de lesión por isquemia/reperfusión orgánica aislada con buenos resultados, logrando disminuir la lesión por reperfusión pulmonar, mejorando la oxigenación, la hemodinamia y la formación de edema pulmonar, y reduciendo la lesión mucosa y orgánica posterior a isquemia/reperfusión gástrica y del páncreas.¹⁶⁻²¹ El nitroprusiato de sodio también ha demostrado reducir la activación endotelial inducida por citocinas, revirtiendo completamente la permeabilidad microvascular

incrementada e inhibiendo la agregación plaquetaria y el tiempo prolongado de trombosis.¹⁵ Sin embargo, su utilidad en isquemia/reperfusión total (choque hemorrágico) no ha sido todavía investigada.

El hígado ha sido seleccionado como órgano blanco debido al papel central que desempeña como modulador de inflamación inducida por choque y reperfusión subsecuente,²² y también debido a que el hígado y el intestino parecen ser los sitios mayormente responsables de la producción incrementada de óxido nítrico posterior a trauma y hemorragia.²³ Los agentes farmacológicos que remueven el exceso del óxido nítrico podrían ser auxiliares útiles para mejorar la función hepática y disminuir la incidencia de falla orgánica múltiple y muerte posterior a trauma y hemorragia. En este estudio evaluamos la capacidad del nitroprusiato de sodio como donador exógeno del óxido nítrico para disminuir la lesión tisular después de choque hemorrágico.

Material y métodos

Para este estudio se utilizaron 72 ratas macho Sprague-Dawley (Charles River Breeding Laboratories, Inc., Portage, MI) con un peso entre 250 y 300 g. Se les permitió acceso *ad libitum* a comida y agua hasta el día de la operación. Después de ser pesadas, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (Nembutal®, Abbott Laboratories, North Chicago, IL) intraperitonealmente (50 mg/kg). Se colocaron en un colchón térmico (MUL-T-PAD®; Gaymar Industries, Inc., Orchard Park, NY), que se conectó a una unidad de terapia de calor (MICRO-TEMP® Pump; Seabrook Medical Systems, Inc., Cincinnati, OH) y se les rasuró la región inguinal. El protocolo experimental fue revisado y aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Borgess Research Institute en el Borgess Medical Center, en Kalamazoo, Michigan, Estados Unidos de Norteamérica. Todos los experimentos fueron practicados de conformidad con la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” de los Institutos Nacionales de Salud.

Técnica quirúrgica

Después de aplicar solución de yodo-povidona, se cubrió la región inguinal en preparación para un procedimiento quirúrgico estéril. Se disecaron y canularon la arteria y vena femoral derechas con catéteres intravenosos (números 22 GA y 19 GA, respectivamente, Intracath; Becton Dickinson, Sandy, UT). El catéter arterial se conectó a un transductor (Transpac Abbot Critical Care Systems, North Chicago, IL). El transductor se conectó entonces a un monitor de presión Hewlett-Packard (78353A; Palo Alto, CA). La línea arterial se utilizó para monitoreo continuo de presión arterial media (PAM) y para toma de sangre. El catéter venoso fue utilizado para la infusión de líquidos.

Diseño experimental

El experimento fue realizado utilizando un modelo de choque hemorrágico no controlado descrito previamente.²² Se inició (tiempo cero) con la extracción de sangre (3 ml/100 g) a través de la cánula arterial en un periodo de 15 minutos, seguido por un periodo de estabilización de 15 minutos. A los 30 minutos se provocó choque hemorrágico no controlado mediante la amputación de la cola en 75 % de su longitud, medida desde la punta (extremo más distal). La sangre obtenida de la herida de la cola se cuantificó y desecharon. Esta fase se denominó “fase prehospitalaria” y se continuó por 60 minutos. Durante este periodo se consiguió la reanimación con solución de ringer lactado (RL); la meta era mantener una PAM de 40 mm Hg, iniciando inmediatamente posterior al corte de la cola. A los 90 minutos se comenzó una fase que simulaba el tratamiento hospitalario (“fase hospitalaria”) mediante la reparación (sutura) de la herida de la cola. Esta fase se continuó por 60 minutos. Durante esta etapa, la reanimación hídrica fue mantenida con solución de RL; el objetivo terminal era mantener una PAM de 70 mm Hg. Se documentó la cantidad de solución de RL utilizada en la reanimación.

A las ratas que sobrevivieron al experimento por 150 minutos ($n = 10$ por grupo) se les retiraron los catéteres, se les suturó la herida y fueron colocadas en contenedores plásticos para observación tardía (tres días). Los animales utilizados para exámenes de laboratorio ($n = 8$ por grupo) fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico a las cuatro horas (240 minutos) del experimento.

Se analizaron cuatro grupos de animales ($n = 18$ por grupo, 10 animales para sobrevida y ocho para exámenes laboratoriales):

- Sham más solución salina (grupo 1, sham sin tratamiento, o sham operado sin tratamiento).
- Sham más 0.5 mg/kg de nitroprusiato de sodio¹⁸ (grupo 2, sham más tratamiento, o sham operado más tratamiento).
- Solución salina (grupo 3, con choque hemorrágico sin tratamiento, o control).
- Nitroprusiato de sodio (0.5 mg/kg)¹⁸ (grupo 4, choque hemorrágico más tratamiento).

En los animales sham-operados no se provocó choque hemorrágico pero fueron sometidos a anestesia e instrumentación (canulados) en forma y tiempos idénticos a los animales en los cuales se provocó choque hemorrágico, y con aplicación de los tratamientos estipulados.

Tratamiento

Todas las ratas fueron tratadas al momento de iniciada la reanimación (tiempo 30 minutos) con solución salina (grupos 1 y 3) o nitroprusiato de sodio (0.5 mg/kg, grupos 2 y 4).¹⁸ El nitroprusiato de sodio (Gensia Pharmaceuticals, INC. Irvine, CA) es disodio pentacianonitrosilferrato(2-)dihidrato, un agente hipotensor inorgánico cuya principal acción farmacológica es la relajación del músculo liso vascular y dilatación consecuente de las arterias y venas periféricas. En la práctica clínica, el nitroprusiato de sodio está indicado en la reducción inmediata de la presión arterial de pacientes en crisis hipertensivas, y en el tratamiento de insuficiencia cardiaca congestiva aguda. Como señalamos, el enfoque biomolecular de la utilización del nitroprusiato de sodio como donador exógeno de óxido nítrico busca los efectos benéficos sobre la cascada proinflamatoria generada, en nuestro modelo, por el choque hemorrágico.

Pruebas de función hepática

Para estimar la lesión hepática y obtener un estudio indicador de falla hepática, determinamos los niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT) a los 150 minutos del experimento ($n = 8$ por grupo). Los niveles de las enzimas fueron medidos con analizador automático marca Hitachi, modelo 917 (Hitachi Ltd., Tokio, Japón).

Mieloperoxidasa de tejido hepático

Se evaluó la actividad de la mieloperoxidasa de tejido hepático en homogenados de tejido hepático y fue utilizada como índice de acumulación neutrofílica en el hígado ($n = 8$ por grupo). Las muestras de tejido fueron obtenidas cuatro horas después de la reanimación, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -79 °C hasta el análisis. Las muestras de hígado (200 a 300 mg) fueron homogenizadas en 5 ml de un *buffer* de fosfato de potasio de 50 mmol/l que contiene 0.5 % de HTAB y entonces fueron sonicadas, dos veces deshieladas, resonadas y centrifugadas por 10 minutos a 14 000 × g a 4 °C. La actividad de la mieloperoxidasa de tejido hepático fue evaluada incubando por tres minutos 100 µL de los sobrenadantes a 37 °C en una solución de reacción con 40 % de salina amortiguada con fosfato, 8 % de DMFA, 1.6 mmol/l de TMB, 0.3 mmol/l de H₂O₂, y 80 mmol/l de fosfato de sodio (pH 5.4).^{24,25} La reacción se detuvo agregando 800 mmol/l de solución de ácido acético enfriada en hielo (pH 3.0) y colocando los tubos de ensayo en hielo. La absorción fue leída a 655 nm. La actividad de la mieloperoxidasa de tejido hepático fue calculada como el cambio en el grado de absorción por minuto por gramo de tejido hepático y multiplicado por el factor de dilución.

Estudios histológicos

Se obtuvieron 32 muestras de tejido hepático ($n = 8$ por grupo) cuatro horas después de la reanimación, fijadas en formaldehído a 10 % y sumergidas en parafina. Se cortaron las muestras (5 m de espesor) y se tiñeron con hematoxilina y eosina para su examen con microscopio electrónico. Se aplicó análisis ciego a todas las muestras. Los cambios histológicos se graduaron de 0 a

4 según la clasificación de Suzuki y colaboradores.²⁶ El grado de necrosis hepática se determinó como sigue: 0, nada; 1, necrosis de una sola célula; 2, 30 % de necrosis lobular; 3, 60 % de necrosis lobular; y 4, > 60 % de necrosis lobular.

Análisis estadístico

Todos los valores incluyen media y error estándar de la media (SEM). Un valor de $p < 0.05$ fue aceptado como estadísticamente significativo. Los datos fueron analizados mediante procedimientos de una sola vía ANOVA (prueba de F para interacción, prueba de F para efectos principales, pruebas de Fisher); prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Mann-Whitney (para igualdad de rangos) y prueba de registro de rangos para efecto de sobrevida (*pair-wise Log-Rank test*). El análisis fue practicado utilizando SAS versión 6.2, SPSS versión 8.0, Minitab versión 12.23, y SigmaStat® versión 2.0.

Resultados

Requerimientos hídricos

Fue necesaria solución de RL para reanimación en todos los grupos, excepto en los sham-operados (grupos 1 y 2). Los requerimientos hídricos promedio para cada uno de los grupos se muestran en la figura 1. Los valores a las 2.5 horas del experimento fueron 16.39 ± 0.43 ml para los controles (grupo 3) y 9.15 ± 0.08 ml para los tratados (grupo 4). Los animales del grupo control requirieron significativamente mayor cantidad de solución de RL que los del grupo tratado ($p = 0.0001$). La diferencia de líquidos entre los grupos 3 y 4 fue significativa.

Pruebas de función hepática

Las enzimas evaluadas en este estudio (AST y ALT) se muestran en la figura 2. Al finalizar la “fase hospitalaria” (150 minutos), los niveles séricos de AST fueron: 65.50 ± 1.36 , 63.87 ± 1.60 ,

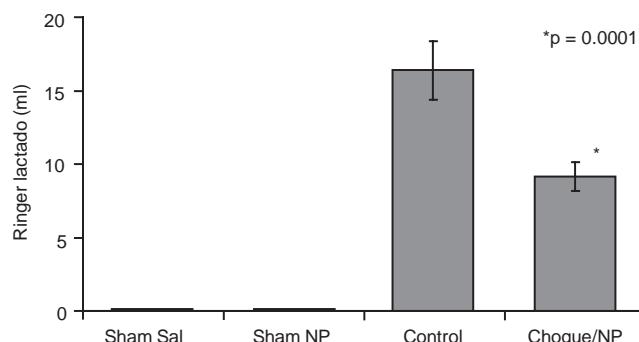


Figura 1. Requerimientos hídricos en los cuatro grupos de animales. Sal = salina, NP = nitroprusíato.

242.12 ± 11.97 , y 69.37 ± 2.62 IU/L para los grupos sham sin tratamiento, sham con tratamiento, control y con choque hemorrágico más nitroprusíato de sodio, respectivamente. Los niveles de AST fueron significativamente más bajos ($p < 0.001$) cuando se comparó el grupo con choque tratado con nitroprusíato de sodio (grupo 4) respecto al control (grupo 3). También se encontraron niveles de AST significativamente menores ($p = 0.0001$) cuando se compararon los grupos sham-operados (grupos 1 y 2) con el control (grupo 3). A los 150 minutos, los niveles séricos de ALT fueron: 46.12 ± 3.30 , 46.12 ± 3.29 , 213.62 ± 3.04 , y 55.75 ± 1.03 IU/L para los grupos sham sin tratamiento, sham con tratamiento, control y choque más nitroprusíato de sodio, respectivamente. Los niveles disminuidos de ALT fueron significativamente diferentes ($p = 0.0001$) cuando los grupos sham operado (grupos 1 y 2) y con choque tratado con nitroprusíato de sodio (grupo 4) fueron comparados con el control (grupo 3).

Mieloperoxidasa de tejido hepático

Determinamos la actividad de la mieloperoxidasa de tejido hepático como un índice de acumulación neutrofílica en el hígado después de choque hemorrágico no controlado (figura 3). Cuatro horas después del choque hemorrágico y la reanimación, los niveles de mieloperoxidasa de tejido hepático estuvieron significativamente

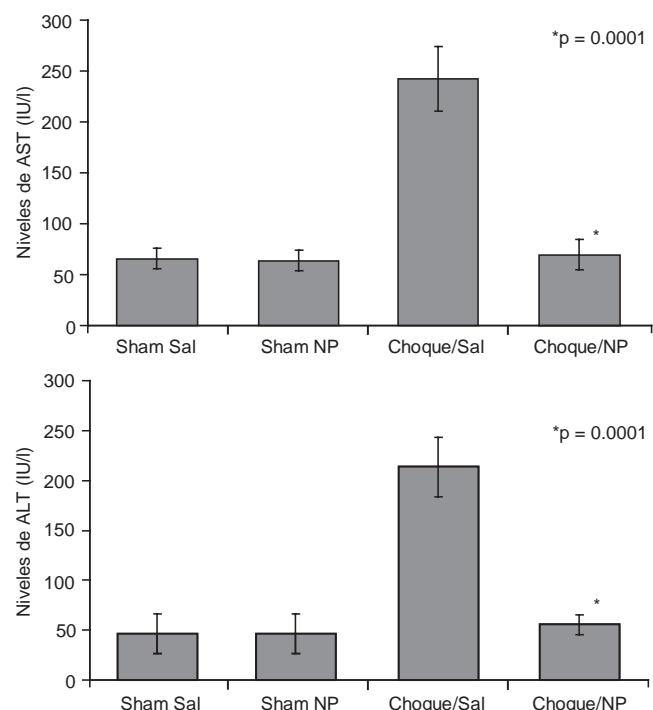


Figura 2. Niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST) y de alanino aminotransferasa (ALT) al finalizar la “fase hospitalaria” (150 minutos). Sal = salina, NP = nitroprusíato, IU = unidades internacionales.

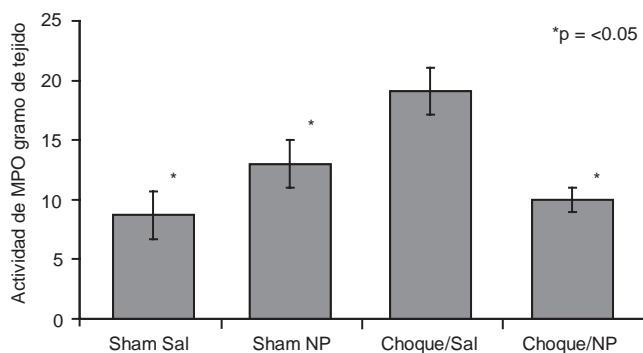


Figura 3. Actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en el tejido hepático cuatro horas después de la reanimación. * $p < 0.05$ versus control.

disminuidos ($p < 0.05$) en las ratas tratadas con nitroprusiato de sodio (grupo 4, 10 ± 0.7 U/g) y en las ratas sham operadas (grupos 1 y 2, 8.7 ± 1 y 13 ± 1 U/g, respectivamente) cuando se compararon con las controles (19.1 ± 1 U/g). Las diferencias entre los grupos 1, 2 y 4 no fueron significativas por análisis de varianza.

Resultados de histología

Cuatro horas después del choque y reanimación (figura 4), la severidad de la congestión sinusoidal (3.37 ± 0.18) y la vacuolización citoplásmica (3.50 ± 0.18) fueron más evidentes en el grupo control ($p = 0.001$) y el grado de necrosis fue de 2.0 ± 0.26 ($p = 0.001$). El uso del nitroprusiato de sodio (grupo 4) redujo significativamente el daño al hígado, resultando en calificaciones de severidad de 0.25 ± 0.16 ($p = 0.001$). En las figuras 5 y 6 se presenta el daño histológico en el grupo control y en el tratado con nitroprusiato de sodio.

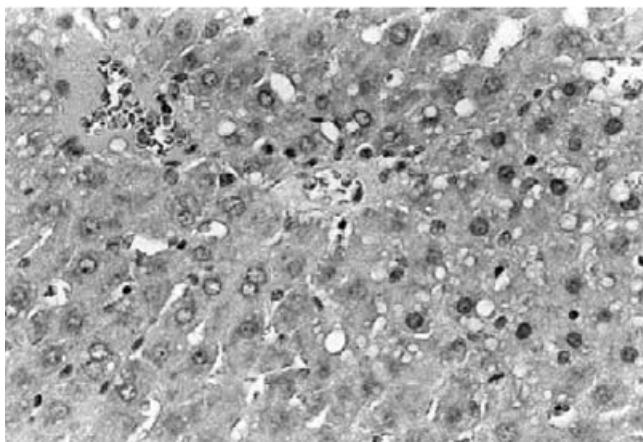


Figura 5. Corte microscópico del hígado de una rata control que muestra congestión sinusoidal y vacuolización citoplásica severas. Hematoxilina y eosina; magnificación original x 100.

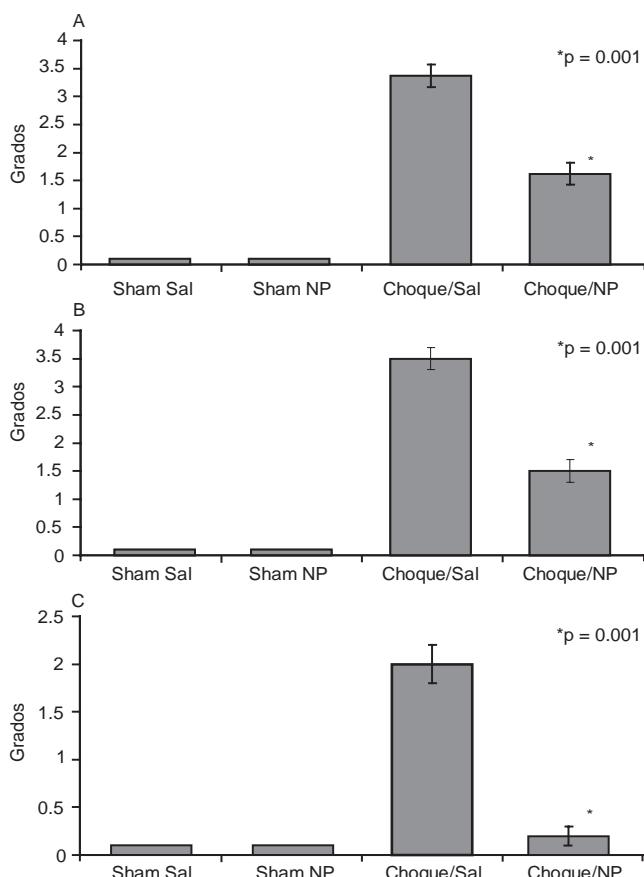


Figura 4. Hallazgos histológicos evaluados de acuerdo con el sistema de graduación de Suzuki y colaboradores.²⁶ A) Congestión. B) Vacuolización. C) Necrosis. * $p < 0.001$ versus control. NP = nitroprusiato, Sal = salina.

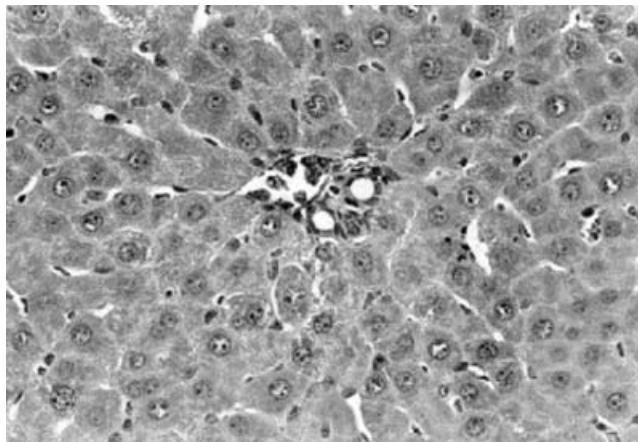


Figura 6. Corte microscópico del hígado de una rata sometida a choque severo y tratada con nitroprusiato de sodio. Se observa congestión leve y vacuolización citoplásica mínima. Hematoxilina y eosina; magnificación original x 100.

Sobrevida

El efecto del nitroprusiato de sodio (grupo 4) en la sobrevida se demuestra en la figura 7. Se observaron mejores tasas de sobrevida en este grupo (60 %) que en el control (40 %), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Discusión

El óxido nítrico desempeña un papel importante en un vasto arreglo de funciones celulares mediando vías de señales de transferencia intracelulares, modulando el estrés oxidativo celular, regulando la activación del factor de transcripción nuclear y mediando la expresión de genes.^{27,28} El óxido nítrico también puede alterar la función orgánica mediante la regulación del flujo sanguíneo regional y la perfusión orgánica.²⁸ Sin embargo, a medida que ha incrementado nuestro conocimiento en relación a los numerosos efectos del óxido nítrico, se ha hecho más evidente la complejidad de su papel durante el choque hemorrágico. La mayoría de los estudios que examinan este aspecto han utilizado inhibidores de la NOS (sintasa del óxido nítrico) que actúan ya sea contra ecNOS o inhibiendo en forma no selectiva ecNOS e iNOS. La actividad de ecNOS está disminuida después del choque hemorrágico,⁹ y proporcionar óxido nítrico con donadores

exógenos en fase temprana de la reanimación mejora la presión sanguínea y la sobrevida a corto plazo.¹⁵ La inhibición de la NOS con compuestos no selectivos o que parcialmente inhiben la ecNOS incrementa la lesión tisular, sugiriendo que la actividad de la ecNOS es esencial para mantener la perfusión orgánica y tisular durante la hipovolemia.^{12,29} El uso de inhibidores con mayor selectividad hacia iNOS, sin embargo, es benéfico contra la lesión tisular inducida por el choque.² Por lo tanto, mantener los efectos protectores de la actividad de la NOS (ecNOS) mientras se previenen los efectos lesivos potenciales de la actividad de la NOS (iNOS excesiva) es un obstáculo en los intentos por manipular terapéuticamente la actividad de la NOS después de choque hemorrágico. Aun los inhibidores más selectivos de la iNOS pueden inhibir potencialmente la ecNOS si se usa una dosis suficiente, debido a que el inhibidor perfectamente selectivo de la NOS no ha sido aún desarrollado.²⁹

La utilidad potencial de reducir los niveles excedidos de óxido nítrico después de choque hemorrágico y las limitaciones de los inhibidores de la NOS desarrollados hasta ahora, se combinan para favorecer la utilidad potencial de compuestos desarrollados para eliminar o enlazar el óxido nítrico en exceso. Un “eliminador” de óxido nítrico debe ser suministrado de manera que no interfiera con la función esencial de la ecNOS e incluso neutralizar el óxido nítrico producido en exceso a partir de la iNOS, que puede mediar el daño tisular.²⁹ En nuestros experimentos utilizamos un donador exógeno de óxido nítrico (nitroprusiato de sodio) al inicio de la reperfusión (reanimación) después del choque hemorrágico, en cuatro grupos diferentes de animales (sham operados, control y uno tratado). En el grupo de animales sometidos a choque hemorrágico, el tratamiento con nitroprusiato de sodio disminuyó la cantidad de líquidos requeridos para reanimación y redujo la lesión hepática inducida por el choque en comparación con los controles tratados con solución salina. La administración de nitroprusiato de sodio también mejoró la sobrevida a tres días al hacer la comparación con los animales tratados con solución salina, y no representó efectos nocivos aparentes en los animales sham operados. Ciertamente esta mejoría no tuvo una significancia estadística, sin embargo, vale la pena recordar que el modelo de choque hemorrágico practicado en nuestros experimentos es muy agresivo pues pretende simular al que sufren las víctimas de trauma con atención muy elemental. Nuestro objetivo se ha centrado en valorar la respuesta inflamatoria de un órgano blanco (el hígado) en estas circunstancias. Los resultados con la terapia utilizada (nitroprusiato de sodio) sugieren que mejorando la respuesta inflamatoria junto con un apoyo integral intensivo, se pudiera mejorar los índices de sobrevida en condiciones de choque hemorrágico. Por consiguiente, limitar la respuesta inflamatoria es solo parte del manejo integral de los pacientes con trauma que caen en falla orgánica múltiple. La reducción de la lesión con nitroprusiato de sodio estuvo asociada a disminución en la infiltración de polimorfonucleares (PMN), sugiriendo que el nitroprusiato de sodio pue-

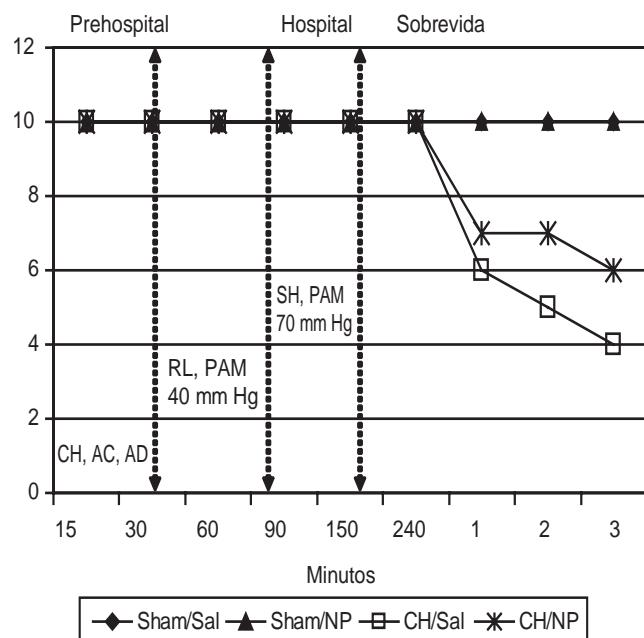


Figura 7. Se muestran los porcentajes de sobrevida. De la misma manera está compuesto el modelo experimental utilizado en este estudio. Sal = salina, NP = nitroprusiato, CH = choque, AD = administración de la droga, RL = ringer lactato, SH = sutura de herida, PAM = presión arterial media.

de reducir la lesión tisular disminuyendo el infiltrado celular inflamatorio inducido por el choque.

En nuestro trabajo, la capacidad del nitroprusiato de sodio para reducir la lesión hepática inducida por el choque fue similar a hallazgos previos de reducción de lesión tisular inducida por choque en ratas tratadas con el inhibidor de iNOS L-N⁶-(1-iminoethyl)lisina y en ratones sin iNOS (genéticamente manipulados).^{2,15} En esos animales, la inhibición de la iNOS después de choque estuvo asociada con infiltración pulmonar disminuida de PMN y con reducción en la respuesta inflamatoria, con una expresión disminuida de IL6 y del factor estimulante de la colonia granulocitaria, y con activación disminuida del nuclear factor- κ B y STAT3.² En forma semejante, una reducción en la respuesta proinflamatoria por el nitroprusiato de sodio puede contribuir a sus efectos benéficos posterior a hemorragia.

Se ha propuesto la hipótesis de que la interacción del óxido nítrico con el superóxido (O_2^-) produce peroxinitrito, que contribuye con la lesión tisular después de isquemia y hemorragia.^{5,6,29} Nosotros detectamos niveles reducidos de AST y ALT como pruebas de funcionamiento hepático, y niveles bajos de mieloperoxidasa de tejido hepático como un índice de infiltración (acumulación) neutrofílica en el hígado. Estos hallazgos pudieran sugerir que los efectos benéficos del nitroprusiato de sodio en la lesión hepática también se deben a menor biodisponibilidad de óxido nítrico en el sitio de la lesión, imposibilitando la formación de peroxinitrito vía interacción con el superóxido y subsiguiente limitación del daño. De la misma manera, el tratamiento con nitroprusiato de sodio bloquearía la expresión de moléculas de adhesión intercelulares, con limitación del rodamiento, aplanamiento e infiltración neutrofílica subsecuente.^{12,17,20} Por lo tanto, el tratamiento con nitroprusiato de sodio después de hemorragia está asociado a un número de efectos benéficos potenciales, incluyendo quizás una reducción en la producción de citocinas proinflamatorias, en la formación de peroxinitrito, infiltración tisular neutrofílica y el daño tisular inducido por el choque. Los hallazgos en el sentido de que los pacientes víctimas de trauma que han experimentado hipotensión expresan iNOS en tejido hepático, sugieren que se necesita investigar más el papel del óxido nítrico en choque hemorrágico.³⁰

Otros autores han sugerido que el óxido nítrico media la descompensación vascular asociada al choque hemorrágico prolongado, y que inhibir el óxido nítrico puede mejorar el tono vascular e incrementar el flujo sanguíneo a tejidos vitales.¹¹ Si bien aún tiene que ser demostrado si el óxido nítrico es responsable de la descompensación vascular después de la hemorragia, en nuestro diseño experimental el nitroprusiato de sodio se administró después que había ocurrido la descompensación vascular. Las ratas tratadas con nitroprusiato de sodio tuvieron menor requerimiento hídrico para reanimación que los animales con solución salina. Por lo tanto, si el óxido nítrico contribuye con la descompensación vascular inducida por el choque, es posible que el nitroprusiato de sodio mejore el tono vascular o la perfu-

sión tisular al eliminar el superóxido (O_2^-), limitando así la biodisponibilidad de óxido nítrico (producido en exceso vía iNOS) y la formación de radicales más potentes.

Determinar si el nitroprusiato de sodio puede prevenir o retrazar la descompensación vascular después de hemorragia, requerirá más estudios, sin embargo, representa un compuesto prometedor para estudiar la producción de óxido nítrico y el efecto de la síntesis de óxido nítrico en los sistemas *in vivo*, utilizando otros órganos como blanco y en modelos de choque hemorrágico. Investigarlo en un modelo de choque hemorrágico nos ha permitido demostrar sus bondades como donador de óxido nítrico. Si bien se usa en el terreno clínico como un potente hipotensor, en la forma que se ha empleado no demostró alteraciones hemodinámicas incontrolables y con repercusiones en la cascada proinflamatoria de los animales tratados. En nuestro estudio, el que los animales hayan requerido menor cantidad de líquidos para reanimación posterior a hipotensión hemorrágica y uso de nitroprusiato, es un reflejo claro de la estabilidad hemodinámica recuperada. De hecho, en pesquisas similares realizadas en pulmón como órgano blanco, pudimos apreciar mejoría en la presión arterial media posterior a hemorragia y la utilización de nitroprusiato de sodio.³¹

Se necesitan más investigaciones en el terreno clínico para determinar la verdadera eficacia del nitroprusiato de sodio como terapia adyuvante a la reanimación posterior a choque hemorrágico. De igual suerte, siguen teniendo un papel importante las disertaciones sobre inhibidores selectivos de la sintasa inducible del óxido nítrico. Poder limitar la producción de óxido nítrico en exceso generado por esta vía, representa una interesante alternativa de estudio, con impacto directo en la limitación del daño multiorgánico y muerte posterior a trauma y hemorragia.

Conclusiones

Demostramos que la administración de nitroprusiato de sodio como un donador potente de óxido nítrico después de choque hemorrágico mejora la respuesta hemodinámica a la hemorragia, reduce la lesión tisular, la acumulación neutrofílica, y mejora la sobrevida a tres días, al hacer la comparación con animales tratados con solución salina. Estos datos apoyan la hipótesis de que el óxido nítrico excesivo generado a través de la iNOS contribuye a la lesión tisular inducida por la hemorragia, y que reducir la biodisponibilidad en exceso de ese óxido nítrico puede ser benéfico después de la hemorragia.

Referencias

1. Moore FA, Sauaia A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC. Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J Trauma* 1996;40:501-512
2. Hierholzer C, Harhrech B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, Peitzman AB, Billiar TR, Twardy DJ. Essential role of induced nitric

- oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med* 1998;187:917-928.
3. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997;11:118-124.
 4. Zsabo C, Billiar TR. Novel roles of nitric oxide in hemorrhagic shock. *Shock* 1999;12:1-9.
 5. Zsabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 1996;6:79-88.
 6. Zsabo C, Zingarelli B, Salzman L. Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite. *Circ Res* 1996;78:1051-1063.
 7. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;6:3051-3064.
 8. Chaudry IH, Ayala A, Ertel W, Stephan RL. Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects. *Am J Physiol* 1990;259:R663-R678.
 9. Zsabo C, Farago M, Horvath I, Lohinai Z, Kovach AG. Hemorrhagic hypotension impairs endothelium-dependent relaxation in the renal artery of the rat. *Circ Shock* 1992;36:238-241.
 10. Kelly E, Shah NS, Morgan NN, Watkins SC, Peitzman AB, Billiar TR. Physiologic and molecular characterization of the role of nitric oxide in hemorrhagic shock: evidence that type II nitric oxide synthase does not regulate vascular decompensation. *Shock* 1997;7:157-163.
 11. Thiemermann C, Zsabo C, Mitchell JA, Vane JR. Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:267-271.
 12. Harbrecht BG, Wu B, Watkins SC, Billiar TR, Pietzmann AB. Inhibition of nitric oxide synthase during severe shock but following resuscitation increases hepatic injury and neutrophil accumulation in hemorrhaged rats. *Shock* 1997;8:415-421.
 13. Yao YM, Bahrami S, Leichtfried G, Redl H, Schlag G. Significance of NO in hemorrhage-induced hemodynamic alterations, organ injury, and mortality in rats. *Am J Physiol* 1996;270(Heart Circ Physiol 39):H1616-H1623.
 14. Brown IP, Williams RL, McKirnan MD, Limjoco UR, Gray CG. Nitric oxide synthesis inhibition does not improve the hemodynamic response to hemorrhagic shock in dehydrated conscious swine. *Shock* 1995;3:292-298.
 15. Menezes J, Hierholzer C, Watkins SC, Lyons V, Peitzman AB, Billiar TR, et al. A novel nitric oxide scavenger decreases liver injury and improves survival after hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1999;277(Gastrointest Liver Physiol 40):G144-G151.
 16. Young JS, Rayhrer CS, Edmisten TD, Cephas GA, Tribble CG, Kron IL. Sodium nitroprusside mitigates oleic acid-induced acute lung injury. *Ann Thorac Surg* 2000;69:224-227.
 17. King RC, Binns OAR, Kanithanon RC, Cope JT, Chun RL, Shockey KS, et al. Low-dose sodium nitroprusside reduces pulmonary reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1997;63:1398-1404.
 18. Yamashita M, Schmid RA, Ando K, Cooper JD, Patterson GA. Nitroprusside ameliorates lung allograft reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1996;62:791-797.
 19. Fukuda H, Sawa Y, Kadoba K, Taniguchi K, Shimazaki Y, Matsuda H. Supplement of nitric oxide attenuates neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation* 1995;(suppl II):II-413-II-416.
 20. Andrews FJ, Malcontenti-Wilson C, O'Brien PE. Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. *Dig Dis Sci* 1994;39:366-373.
 21. Benz S, Schnabel R, Weber H, Pfeffer F, Wiesner R, Breitenbuch PV, et al. The nitric oxide donor sodium nitroprusside is protective in ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *Transplantation* 1998;66:994-999.
 22. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Collins TJ, Smejkal R, McClaren J, Crouch LD, Ward PA. Dual blockade of P-selectin and B-2-integrin in the liver inflammatory response after uncontrolled hemorrhagic shock. *J Am Coll Surg* 1998;187:22-31.
 23. Smail N, Catania RA, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Gut and Liver: the organs responsible for increased nitric oxide production after trauma-hemorrhage and resuscitation. *Arch Surg* 1998;133:399-405.
 24. Suzuki K, Ota H, Sasagawas S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 1983;132:345-352.
 25. Andrews PC, Krinsky NI. Human myeloperoxidase and hemimyeloperoxidase. In: di Sabato G, and Everse J, eds. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press;1986:369-371.
 26. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodríguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993;55:1265-1272.
 27. Lander HM, Ogiste JS, Teng KK, Novogrodsky A. p21^{ras} as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J Biol Chem* 1995;270:21195-21198.
 28. Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I- by nitric oxide mediates inhibition of NF. *J Biol Chem* 1995;270:14214-14219.
 29. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002;105:248-258.
 30. Kelly E, Hierholzer C, Harbrecht BG. Traumatic shock induces type 2 nitric oxide synthase mRNA expression in the human liver. *Surg Forum* 1996;47:32-33.
 31. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Walsh J, Guo RF, Reuben J, Ward PA. Exogenous nitric oxide donor and related compounds protect against lung inflammatory response following hemorrhagic shock and resuscitation. *J Trauma Injury Infect Crit Care* 2004;57:980-988.