

Incremento en la concentración de óxido nítrico y metahemoglobina en eritrocitos

contenidos en bolsas para transfusión sanguínea

Palabras clave: Eritrocitos, metahemoglobina, óxido nítrico, paquete globular, transfusión sanguínea.

Key words: Erythrocytes, meta-hemoglobin, nitric oxide, globular package, blood transfusions.

Recibido: 13/07/2007

Aceptado: 21/09/2007

José Gutiérrez-Salinas,* Leticia Cruz-Tovar,* Sergio García-Méndez**

* Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

** Banco de Sangre, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

Correspondencia:

Dr. José Gutiérrez Salinas,
Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental,
División de Investigación Biomédica,
Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE,
San Lorenzo No. 502, 2º piso, Col. Del Valle, 03100, México D.F.
Tel.: 5200-5003, ext. 14603 Fax: 5559-3256. E-mail: quauhtlicutli@yahoo.com

21

Resumen

La transfusión de paquete globular puede representar un riesgo para el paciente que lo recibe, ya que el metabolismo del eritrocito durante su almacenamiento produce sustancias responsables de diversas reacciones en el organismo. En el eritrocito, el óxido nítrico reacciona con la hemoglobina y forma metahemoglobina y nitritos. Ambos metabolitos acumulados en el paquete globular pueden producir alteraciones en el sujeto que lo recibe. **Objetivo:** Determinar si los paquetes globulares preservados bajo condiciones óptimas en un banco de sangre presentan alteraciones en la concentración de óxido nítrico y metahemoglobina a lo largo del tiempo. **Material y métodos:** Se eligieron doce paquetes globulares siguiendo los procedimientos rutinarios del banco de sangre de nuestra institución. Se tomaron muestras de cada paquete diariamente por cinco días y posteriormente cada cinco

Abstract

The transfusion of globular package can represent a risk for the patient that receives it since the metabolism of the erythrocyte during its storage substances that can be responsible for diverse reactions in the organism can take place. In the erythrocytes the nitric oxide can react with hemoglobin to form meta-hemoglobin and nitrates. Both substances contained in the globular package can produce alterations in the human that receives it. **Objective:** Our objective was to determine if globular packages preserved under normal conditions in a Blood Bank present alterations in the concentration of nitric oxide and meta-hemoglobin along the time. **Material and methods:** Twelve globular packages were chosen following the routine procedures of the Blood Bank of our institution. Samples of each package were obtained daily for five days and every five days until 30 days. Concentration

días durante 30 días. En las muestras se determinó la concentración de nitratos totales (como un índice del óxido nítrico) y el porcentaje de metahemoglobina. **Resultados:** Existe un incremento importante en la concentración de nitratos totales y de metahemoglobina a lo largo del tiempo en los eritrocitos obtenidos de los paquetes globulares. **Conclusiones:** El incremento en la concentración de óxido nítrico en los paquetes globulares, así como de metahemoglobina, puede ser un factor que provoque reacciones adversas en el paciente que recibe una transfusión sanguínea.

of total nitrates (as an index of the presence of the nitric oxide) and meta-hemoglobin were determined. **Results:** An important increment was show in the concentration of total nitrates and meta-hemoglobin along the time in the erythrocytes from globular packages. **Conclusions:** The increment in the concentration of nitric oxide and meta-hemoglobin in the globular packages it can be a factor that produces adverse reactions in the patient that receives a blood transfusion.

Introducción

Uno de los objetivos principales de la transfusión sanguínea es mantener una adecuada oxigenación de los tejidos del receptor para aumentar su sobrevida ante un evento patológico determinado. Así, la transfusión sanguínea (también llamada transfusión de paquete globular o de eritrocitos) es un recurso terapéutico muy usado en personas que padecen algún tipo de anemia (leucemia, por ejemplo), en cirugías mayores (cardiaca y de grandes vasos), en niños prematuros, etc.^{1,2}

Sin embargo, a pesar de sus ventajas y potencial terapéutico, la transfusión de componentes sanguíneos no está exenta de riesgos y peligros para el receptor. La transfusión de paquetes globulares a sujetos adultos ha sido asociada con reacciones inmunológicas, infecciones severas (por ejemplo neumonía y septicemia), reacciones hemolíticas, manifestaciones de intoxicación o reacción adversa a los componentes químicos incluidos en las bolsas para preservación de eritrocitos; sobrecarga circulatoria, hipercalcemia, hipercalemia, sobrecarga de sodio, entre otras.¹⁻⁶

Por otro lado, un paquete globular puede contener elementos tóxicos y/o dañinos para el receptor transmitidos directamente del donante (virus de la hepatitis, HIV, etc.) o ser originados durante el proceso de almacenamiento en donde los productos o subproductos del metabolismo normal del eritrocito tienden a acumularse y pueden ser una fuente de metabolitos tóxicos para el

receptor. Así, ha sido reportado que en bolsas que contienen paquetes de eritrocitos destinados para transfusión pueden existir compuestos que potencialmente representan un riesgo para la salud del individuo transfundido. De esta forma, se ha reportado la presencia en paquetes globulares de proteínas leucocitarias, factores de crecimiento, metabolitos derivados de la acción de los radicales libres (malondialdehído y lipoperóxidos en general), fragmentos de hemoglobina, presencia de compuestos derivados de los plásticos que rodean a las bolsas que contienen a los eritrocitos, entre otros.⁷⁻¹⁴

Por otro lado, es conocido el hecho de que el óxido nítrico (NO por sus siglas en inglés para Nitric Oxide) es un metabolito producido en el organismo, principalmente en los epitelios de los vasos sanguíneos en donde ejerce una acción reguladora del tono vascular.¹⁵

Además, el NO ha sido implicado en diversos mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos tales como el estímulo nervioso, la activación de plaquetas en la coagulación y septicemia, la activación de leucocitos en procesos infecciosos, alteraciones en enfermedades coronarias, diabetes mellitus, hipertensión sistémica, hipertensión pulmonar, prematuros, etc.¹⁶⁻¹⁸

Por otro lado, bajo condiciones normales de un individuo, el NO que se forma en los epitelios vasculares puede atravesar la membrana celular del eritrocito y combinarse con la oxihemoglobina formando metahemoglobina (meta-Hb) y ni-

tratos (NOx).¹⁹⁻²² La met-Hb, una vez formada, es un compuesto que presenta una afinidad menor por el oxígeno, lo que provoca una menor oxigenación de los tejidos. Por su parte, los nitratos que se forman pueden nuevamente, mediante reacciones de óxido-reducción con el hierro de la hemoglobina, formar nitritos que reaccionan con otras moléculas y las dañan.¹⁹⁻²⁵

Todos estos eventos ocurren en la circulación sanguínea en donde existe un equilibrio en el eritrocito entre la formación de NOx y meta-Hb y el NO que existe en el medio que lo circunda;¹⁹⁻²⁵ sin embargo, en condiciones *in vitro* o de estasis sanguínea (como la que ocurre en una trombosis local), este aparente equilibrio se rompe y los eritrocitos pueden acumular meta-Hb y NOx, lo que provocaría serias alteraciones locales y/o generales al organismo.¹⁹⁻²⁷

Puesto que los eritrocitos que son preservados como paquetes globulares destinados a la transfusión sanguínea pueden ser una fuente potencial de meta-Hb y NOx para el receptor, el objetivo del presente trabajo es determinar si los paquetes globulares preservados bajo condiciones óptimas en un banco de sangre presentan alteraciones en la concentración de NOx y meta-Hb a lo largo de treinta días de almacenamiento.

Material y métodos

Todos los reactivos químicos fueron obtenidos de Sigma (Sigma Chemical Saint Louis, USA), de Merck (Merck de México SA) o de Mallinckrot (Mallinckrot de México SA) de grado analítico y de la mejor calidad posible.

Obtención de paquetes globulares y diseño experimental

Se obtuvieron muestras de sangre de 12 sujetos masculinos (25 a 40 años de edad) aparentemente sanos y que acuden al banco de sangre de nuestra institución como donadores voluntarios.

Las muestras de sangre (cerca de 400 mL) se obtuvieron utilizando el protocolo que normalmente se sigue en esta Unidad. La sangre fue obtenida por venopunción y se colocó en un sistema de bolsas de plástico cuádruples (Baxter-Fenwal; Unidad Bolsag con CPD/ADSOL, Opti-System PL-146), con salida superior e inferior. La sangre total fue centrifugada a 2000 rpm por 12 minutos, después las bolsas fueron colocadas en el sistema Optipress (Baxter-Fenwal) para separar al paquete globular (eritrocitos) del plasma y del concentrado de leucocitos (buffy coat). Una vez obtenidas las bolsas que contienen a los paquetes globulares, fueron almacenadas y mantenidas en refrigeración (1 a 6 °C) bajo las condiciones normales de almacenamiento del banco de sangre, dejándose en esas condiciones durante el tiempo que duró el estudio. Todos los procedimientos fueron realizados conforme a normas y procedimientos establecidos para el manejo de muestras sanguíneas en el banco de sangre de nuestra institución.

Las bolsas que contienen el paquete globular fueron puncionadas por una de sus salidas con jeringa de plástico bajo condiciones estériles y se aspiró una muestra (10 mL) de eritrocitos. Una vez tomada la muestra, la salida de la bolsa fue sellada para mantener la esterilidad del sistema. La toma descrita con anterioridad se llevó a cabo al momento de ser preparados los paquetes globulares (tiempo cero) y cada día por cinco días consecutivos, y posteriormente, cada cinco días hasta por treinta días totales. Las muestras de eritrocitos así obtenidas fueron procesadas el mismo día de su obtención de acuerdo a los procedimientos descritos por Gutiérrez et al.²⁸ como se describe a continuación: La muestra de eritrocitos fue colocada en un tubo de vidrio y centrifugada a 1,500 rpm por 15 minutos. Al término de la centrifugación, el sobrenadante (SBte) fue aspirado con pipeta Pasteur y reservado para su posterior análisis. Al precipitado de eritrocitos se le agregaron tres volúmenes de solución salina isotónica fría con amortiguador de fosfatos (PBS, pH 7).

Los eritrocitos fueron centrifugados nuevamente bajo las condiciones ya descritas con anterioridad y se descartó el sobrenadante para agregarse nuevamente PBS frío y lavar dos veces más el paquete de eritrocitos. Una vez obtenidos los eritrocitos, se les agregó PBS para obtener un hematocrito a 50% y ser usados en las determinaciones subsiguientes.

Determinación de óxido nítrico

Como un reflejo de la concentración de óxido nítrico presente en el SBte de las muestras, se determinó la cantidad de nitratos totales (NOx) de acuerdo con la técnica reportada por Cortas y Wakid,²⁹ el cual deriva todos los nitratos usando gránulos activados de cadmio y determinando los nitratos con el reactivo de Griess. Brevemente se prosiguió como sigue: un volumen de SBte fue filtrado a través de un filtro de 0.22 μ m (Millex-GV, PVDF-durapore, Millipore Co, Bedford MA USA). El filtrado fue desproteinizado agregando cuatro volúmenes de solución de sulfato de zinc (75 mm) e hidróxido de sodio (55 mm) agitando brevemente y centrifugando a 5,000 rpm por 10 minutos para recuperar el sobrenadante. Un volumen del sobrenadante libre de proteínas (SsP) fue usado para su derivación con gránulos activados de cadmio de la siguiente forma: previo al uso del cadmio, éste fue activado colocándolo con varios volúmenes de H_2SO_4 (0.1 M) 24 horas antes de su uso. El ácido es retirado y el cadmio lavado tres veces con agua bidestilada. Terminado dicho lavado, se agitó por dos minutos con una solución de sulfato de cobre (5 mm) en amortiguador de glicina-NaOH (0.2 M de glicina ajustado su pH a 9.7 con una solución 2 M de NaOH). Terminado el periodo de agitación, el cadmio es lavado tres veces con amortiguador de glicina-NaOH, usándose inmediatamente.

En un recipiente adecuado, se mezclan un volumen de SsP junto con un volumen de cadmio

activado y de amortiguador de glicina-NaOH y cuatro volúmenes de agua bidestilada. La mezcla se agita constantemente por 90 minutos, al término de los cuales se recuperan dos volúmenes de sobrenadante para agregarles 2.5 volúmenes de agua bidestilada. Se mezclan por agitación y se agrega un volumen de sulfanilamida (3% p/v en HCl 0.4N) y de N-naptiletilendiamina (0.1% p/v en agua bidestilada). La mezcla se agita brevemente y se deja incubar 30 minutos, al término de los cuales se lee a 540 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6300, Cielovista, Cal. USA). La concentración de óxido nítrico se reporta como nitratos totales (NOx) de acuerdo con una curva patrón hecha con concentraciones variables de KNO_3 en el rango μ M.²⁹

Determinación de metahemoglobina

Se determinó el porcentaje de metahemoglobina (meta-Hb) en los eritrocitos de los grupos en estudio de acuerdo a la técnica reportada por Kohn y cols.³⁰ Brevemente, se prosiguió de la siguiente manera: a un volumen de paquete eritrocitario se le agregan 5.5 volúmenes de agua bidestilada y se incuban por diez minutos a temperatura ambiente. Al término de la incubación, la muestra es centrifugada a 14,000 rpm por 15 minutos. Se recupera el sobrenadante (hemolizado) y se reserva para la determinación de meta-Hb. La meta-Hb se determina como sigue: se colocan 100 mL de hemolizado en una cubeta (1 mL de capacidad) de cuarzo y se determina la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6300, Cielovista, Cal. USA). Una vez hecha esta primera lectura, se le agregó al hemolizado 50 mL de una solución de cianuro de sodio (5.3% p/v) en ácido acético (5.6% v/v) y se agitan brevemente para hacer una segunda lectura a 630 nm. La absorbancia de la muestra sin cianuro menos la absorbancia de la muestra con cianuro es una medida de la presencia de meta-Hb.³⁰

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedios \pm error estándar de 12 muestras (paquetes globulares) independientes, realizando al menos tres determinaciones de metabolitos por muestra de punción. Los resultados fueron analizados usando el programa estadístico GraphPad Prism V-4.00 (GraphPad Software, San Diego, Cal., USA). Los datos se analizaron usando la prueba t de Student tomando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

La figura 1 muestra el curso temporal de la concentración de óxido nítrico (expresado como nitratos totales; NOx) determinado en el sobrenadante de los paquetes globulares almacenados en refrigeración (1 a 6 °C) hasta por 30 días.

En el inserto (gráfica menor de la figura 1) se muestra la concentración de NOx a tiempo cero (día de extracción y procesamiento de la sangre total) y la concentración de este metabolito a lo largo de los primeros cinco días de almacenamiento del paquete globular. Tal como se puede observar, existe un incremento en la concentración de NOx desde el primer día de almacenamiento; sin embargo, dicho incremento es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) a partir del tercer día de almacenamiento, cuando se eleva la concentración de NOx en 52.63% con respecto de la concentración de este metabolito a tiempo cero ($63.4 \pm 4.9 \mu\text{M}$ vs $32.3 \pm 5.0 \mu\text{M}$, respectivamente). La concentración de NOx se eleva gradualmente conforme pasa el tiempo y llega a ser de 96.28% ($63.4 \pm 4.8 \mu\text{M}$) con respecto del tiempo cero, al quinto día de almacenamiento. El curso temporal en la concentración de NOx en el sobrenadante de los paquetes globulares determinada cada cinco días y preservados hasta por 30 días se muestra en la gráfica mayor de la figura 1. Tal como puede observarse, el perfil de incre-

mento en la concentración de NOx mostrada durante los primeros cinco días de almacenamiento del paquete globular se mantiene a lo largo de los 30 días que duró el estudio. Es de notar que la concentración de NOx muestra un incremento promedio sostenido de 96% con respecto del periodo inmediato inferior a los 10, 15 y 20 días de almacenamiento de los paquetes globulares; esto es, que la concentración de NOx presenta un incremento de cerca de 96% cada cinco días en el periodo que va de los 10 a los 20 días de almacenamiento de los paquetes globulares. A su vez, a los 25 y 30 días de almacenamiento, el porcentaje promedio de incremento entre ambos periodos en la concentración de NOx es de 155%. Además, dichos periodos de tiempo son los que registran la mayor concentración de este metabolito en comparación con el tiempo cero ($203.4 \pm 8.3 \mu\text{M}$ y $256.4 \pm 9.8 \mu\text{M}$ vs $32.3 \pm 5.0 \mu\text{M}$; respectivamente $p < 0.001$).

Por su parte, el curso temporal de la concentración de meta-Hb en los eritrocitos de los paquetes globulares preservados hasta por 30 días se muestra en la figura 2.

Tal como fue descrito para la figura 1, en el inserto (gráfica menor) de esta figura se muestra el curso temporal de la concentración de meta-Hb a tiempo cero y durante los primeros cinco días de almacenamiento. Como puede observarse, al igual que lo que sucede con la concentración de NOx, el porcentaje de meta-Hb presente en los paquetes globulares, muestra un incremento estadísticamente significativo de 68.18% con respecto del tiempo cero ($p < 0.05$) a los tres días de almacenamiento. A los cinco días, el incremento en el porcentaje de meta-Hb es de 159.09% con respecto del tiempo cero ($0.57 \pm 0.03\%$ vs $0.22 \pm 0.015\%$, respectivamente; $p < 0.05$).

Por otro lado, la gráfica mayor de la figura 2 muestra el curso temporal de la concentración de meta-Hb en periodos de cinco días y hasta por 30 días, bajo las condiciones ya descritas. El incremento en la concentración de meta-Hb en

los eritrocitos se presenta en forma gradual conforme pasa el tiempo de almacenamiento y llega a ser, a los 30 días, de hasta 959% sobre el porcentaje de dicho metabolito que existe a tiempo cero ($2.33 \pm 0.1\%$ vs $0.22 \pm 0.015\%$, respectivamente; $p < 0.001$).

Discusión

La transfusión de eritrocitos preservados en bolsas como paquetes globulares y que son almacenados en un banco de sangre representan uno de los productos biológicos más frecuentemente usados en el tratamiento de diversas patologías que comprometen el estado de salud del sujeto.¹⁻⁷ Sin embargo, su uso, aun bajo condiciones de extrema seguridad, puede representar un riesgo para la salud del individuo transfundido.¹⁻⁷

Un paquete globular o concentrado de eritrocitos que se almacena en el banco de sangre puede contener sustancias o metabolitos que provienen ya sea del sujeto donante (por ejemplo virus, factores de crecimiento, anticuerpos, leucocitos y tromboxanos), o sustancias que se producen dentro del recipiente que los contiene y que generalmente son productos del deterioro normal que sufre el eritrocito o como resultado del metabolismo normal que lleva a cabo esta célula.^{1,6-14,31,32} En cualquier caso, ambas posibilidades representan un riesgo potencial para el receptor de dicho paquete globular y, aunque ciertos elementos que representan un riesgo directo para la salud pueden ser detectados (como es el caso de los virus, los anticuerpos y los grupos sanguíneos), no todas las sustancias contenidas en un paquete globular pueden ser detectadas y neutralizadas.

Lo anterior es importante para los metabolitos originados por el deterioro normal de los eritrocitos o como consecuencia directa del metabolismo normal que esta célula lleva a cabo bajo condiciones de almacenamiento.

De esta forma, ha sido reportado que existe a lo largo del tiempo de almacenamiento una acumulación de sustancias potencialmente tóxicas para el organismo, tales como lipoperóxidos, fragmentos de hemoglobina, fragmentos de membranas de eritrocitos, acumulación de calcio, sodio y potasio, disminución del pH del paquete globular, acumulación de ácido láctico, entre otras más.^{6-14, 31-38}

Al igual que muchas sustancias que acompañan al eritrocito en un paquete globular, el óxido nítrico (NO) está presente dentro del eritrocito, ya que éste reacciona con la hemoglobina, formando meta-Hb y nitratos.^{15,16,19,21-24,26} En condiciones normales, el porcentaje de meta-Hb presente en los eritrocitos no es superior a 0.3%

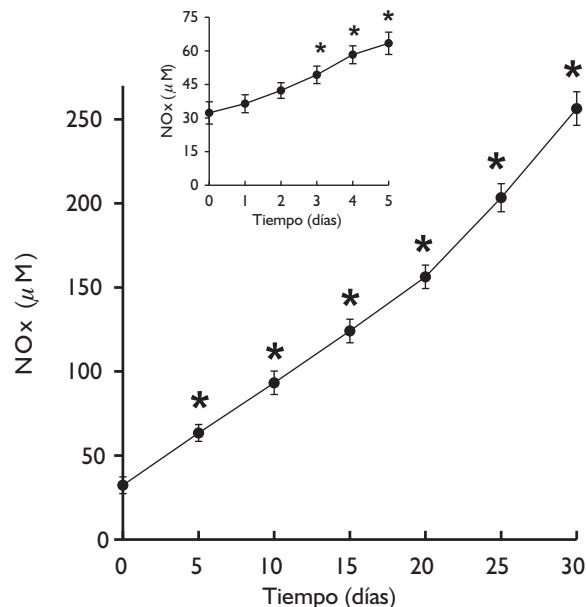


Figura 1. Curso temporal de la concentración (μM) de óxido nítrico expresado como nitratos totales (NOx) en paquetes globulares preservados hasta por 30 días. El inserto (gráfica menor) muestra la concentración de dicho metabolito dentro de los primeros cinco días y la gráfica mayor representa la concentración de dicho metabolito hasta los 30 días de almacenamiento del paquete globular. Los resultados están expresados como promedios \pm el error estándar de 12 muestras independientes y al menos tres determinaciones por muestra. * $p < 0.05$ vs tiempo cero.

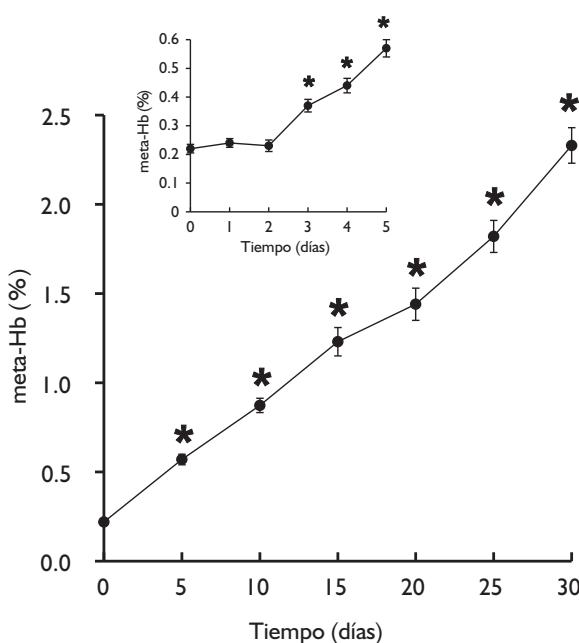


Figura 2. Curso temporal del porcentaje de metahemoglobina (meta-Hb) en eritrocitos provenientes de paquetes globulares preservados hasta por 30 días. El inserto (gráfica menor) muestra el porcentaje de dicho metabolito dentro de los primeros cinco días de almacenamiento, mientras que la gráfica mayor ilustra el porcentaje de dicho metabolito hasta los 30 días de almacenamiento del paquete globular. Los resultados están expresados en porcentaje de promedios \pm el error estándar de 12 muestras independientes y al menos tres determinaciones por muestra. * $p < 0.05$ vs tiempo cero.

mientras que la concentración de nitratos fluctúa alrededor de 25 a 45 μM en el plasma fresco humano.^{15,16,19,21-24,26} Dichas cantidades de metabolitos están presentes en los paquetes globulares frescos, tal como lo muestran nuestros resultados (figuras 1 y 2). Por otro lado, conforme pasa el tiempo, ambos metabolitos se acumulan gradualmente llegando a ser máximos a los 30 días de almacenamiento.

La gradual acumulación de NO en los eritrocitos contenidos como paquetes globulares puede explicar el incremento en el porcentaje de meta-Hb y la concentración de nitratos presentes ya que ha sido reportado que el NO es un compuesto que espontáneamente reacciona tanto *in*

vivo como *in vitro* con la oxihemoglobina formando meta-Hb y NOx.¹⁹⁻²²

El origen exacto de la gradual acumulación de NO en los paquetes globulares a lo largo del tiempo debe ser investigada. Sin embargo, una posibilidad para dicho comportamiento es el hecho de que se ha reportado que existen reacciones de óxido-reducción espontáneas llevadas a cabo entre los NOx y el hierro contenido en la hemoglobina.^{15,19-25,38} Estas reacciones de óxido-reducción hacen que los NOx presentes en el medio ambiente produzcan nuevamente NO y que éste a su vez «ataque» a las moléculas de hemoglobina aumentando de esta forma la concentración de meta-Hb. Puesto que la concentración de hemoglobina en un paquete de eritrocitos es muy grande, se establece un círculo de oxidación-reducción en donde el resultado final es la acumulación progresiva de NOx y de meta-Hb.

La acumulación de estos dos metabolitos en el paquete globular puede ser altamente riesgosa para el paciente que lo recibe, ya que tanto la meta-Hb como los NOx pueden provocar hipoxia (en el primer caso) o alteraciones generales (en el segundo) relacionadas con los procesos fisiológicos normales del individuo.

27

Conclusiones

Buena parte del éxito de una transfusión sanguínea reside en que los eritrocitos obtenidos de donantes sanos permanezcan sin cambios aparentes durante el tiempo que pasan en almacenamiento bajo condiciones óptimas, de acuerdo a normas y procedimientos seguidos por los bancos de sangre de instituciones hospitalarias públicas y privadas.

Sin embargo, una vez que los eritrocitos salen del donante, tienden a presentar diversos cambios a nivel metabólico y estructural, aun cuando hayan sido almacenados bajo condiciones óptimas, por lo que el prolongado almacenamiento de pa-

quetes globulares puede representar un riesgo para la salud del sujeto que lo recibe.

Es por eso que los paquetes globulares destinados a la transfusión en humanos deben ser dispuestos lo más frescos posibles para de esa forma evitar la entrada de sustancias dañinas que comprometan el estado de salud del paciente, tales como la meta-Hb y los NOx.

Referencias

1. Bunn HF, May MH, Kocholaty WF, Shields CE. Hemoglobin function in stored blood. *J Clin Invest* 1969; 48: 311-321.
2. García Escamilla RM, Méndez López TIA. Reacciones adversas por transfusión sanguínea en pacientes cardiópatas. *Rev Mex Patol Clin* 2006; 53(3): 139-145.
3. Serrano VX. Hemotransfusión como factor de riesgo en cirugía cardiaca. *Arch Cardiol Mex* 2006; 76(2): 86-91.
4. Rodríguez MH. TRALI: daño pulmonar agudo por transfusión. *Rev Med IMSS* 2004; 42(6): 501-506.
5. Barba EJR. Transfusión de sangre y sus componentes: riesgos, beneficios e indicaciones. *Rev Mex Patol Clin* 2004; 51(2): 97-118.
6. Nishiyama T, Hanaoka K. Free hemoglobin concentration in patients receiving massive blood transfusion during emergency surgery for trauma. *Can J Anesth* 2000; 47: 881-885.
7. Estep TN, Pedersen RA, Miller TJ, Stupar KR. Characterization of erythrocyte quality during the refrigerated storage of whole blood containing di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Blood* 1984; 64: 1270-1276.
8. Cint C, Johansen JS, Swko F, Price PA, Nielsen HJ. Accumulation of the neutrophil-derived protein YKL-40 during storage of various blood components. *Inflamm Res* 2001; 50: 107-111.
9. Nielsen HJ. Detrimental effects of perioperative blood transfusion. *Bri J Surg* 1995; 82: 582-587.
10. Nielsen HJ, Werther K, Mynster T, Brünner N. Soluble vascular endothelial growth factor in various blood transfusion components. *Transfusion* 1999; 39: 1078-1083.
11. Szpisják D, Edgell DS, Bissonnette B. Potassium as a surrogate marker of debris in cell-salvaged blood. *Anesth Analg* 2000; 91: 40-43.
12. Korgum DK, Bilmen S, Yesilkaya A. Alterations in the erythrocyte antioxidant system of blood stored in blood bags. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001; 109: 357-363.
13. Deepa DV, Manoj KV, Arun P, Santhosh A. Increase lipid peroxidation of erythrocytes in blood stored in polyvinyl chloride blood storage bags plasticized with di-(2-ethyl hexyl) phthalate and effect of antioxidants. *Vox Sang* 1998; 75(3): 198-204.
14. Hill HR, Oliver KC, Lippert LE, Greenwalt TJ, Hess JR. The effects of polyvinyl chloride and polyolefin blood bags on red blood cells stored in a new additive solution. *Vox Sang* 2001; 81(3): 161-166.
15. Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Gladwin MT. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 697-705.
16. Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53(4): 503-514.
17. Stankevicius E, Kévelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina* 2003; 39(4): 333-341.
18. Manukhina EB, Downey HF, Mallet RT. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Exp Biol Med* 2006; 231: 343-365.
19. May JM, Zhi-Chao Q, Xia L, Cobb CE. Nitric uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C1946-C1954.
20. Gladwin MT, Schechter AN. NO contest: Nitrite versus S-nitroso-hemoglobin. *Circ Res* 2004; 94: 851-855.
21. Recchia FA, Voger TR, Hintze TH. NO metabolites accumulate in erythrocytes in proportion to carbon dioxide and bicarbonate concentration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H852-H856.
22. Gladwin MT, Wang X, Reiter CD, Yang BK. S-nitrosohemoglobin is unstable in the reductive erythrocyte environment and lacks O₂/NO-linked allosteric function. *J Biol Chem* 2002; 277: 27818-27828.
23. Rodkey FL. A mechanism for the conversion off oxyhemoglobin to methemoglobin by nitrite. *Clin Chem* 1976; 22(12): 1986-1990.
24. Noble DN, Swift HR, Williams DLH. Nitric oxide release from S-nitrosoglutathione (GSNO). *Chem Commun* 1999; 18: 2317-2318.
25. Noble DR, Williams DLH. Nitrosation products from S-nitrosothiols via preliminary nitric oxide formation. *J Chem Soc Perkin Trans* 2002; 2: 1834-1838.
26. Van Der Lee I, Zanen P, Bidesma DH, van der Bosch JMM. The effect of red cell transfusion on nitric oxide diffusing capacity. *Respiration* 2004; 72: 512-516.
27. Gutiérrez-Salinas J, Zentella de Piña M, Piña E. Acute ethanol intake produces lipid peroxidation in rat red blood cells membranes. *Biochem Mol Biol Int* 1993; 29: 263-270.
28. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990, 38: 1440-1443.
29. Kohn MC, Melnick RL, Ye F, Portier CJ. Pharmacokinetic of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. *Drug Metabolism and Disposition*, 2002; 30: 676-683.
30. Nagaprasad VA, Megha SA. Sequential analysis of the influence of blood storage on aggregation, deformability and shape parameters of erythrocytes. *Clin Hemorhe Microcirc* 1998; 18(4): 273-284.
31. Sezdi M, Bayik Y, Ulgen Y. Storage effects on the cole-cole parameters of erythrocyte suspensions. *Physiol Meas* 2006; 27: 623-635.
32. Bratosin D, Leszczynski S, Sartiaux C, Fontaine O. Improved storage of erythrocytes by prior leukodepletion: flow cytometric evaluation of stored erythrocytes. *Cytometry* 2001; 46(6): 351-356.
33. Waltemath C. The effect of pH and blood gas correction on DPG and plasma potassium content of stored blood. *Canad Anaesth Soc J* 1975; 22: 164-170.
34. Racer J, Herynkova R, Holecek V, Faltysova J, Krejcová I. What is the source of free radicals causing hemolysis in stored blood? *Physiol Res* 2001; 50: 383-388.
35. Meyerstein N, Mazor D, Dvilkansky. Erythrocyte agglomeration and survival studies in citrate-phosphate-dextrose (CPD) units. *J Ann Hematol* 1979; 39(3): 211-216.
36. Hardy JF, Bélisle S. Erythrocyte transfusion: friend or foe? *Can J Anesth* 2001; 48(6): 1-7.
37. Borghi B, Van Oven H. Reducing the risk of allogeneic blood transfusion. *JAMC* 2002; 166(3): 332-334.
38. Denicola A, Souza JM, Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3566-3571.