



Trabajo original

Óxido nítrico y meta-hemoglobina en bolsas para transfusión sanguínea

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

Resumen

Introducción: La transfusión de paquete eritrocitario no carece de riesgos para el receptor ya que éste puede contraer una infección o alguna otra alteración en su salud ya que los eritrocitos almacenados presentan un metabolismo activo capaz de producir metabolitos dañinos para el receptor. **Objetivo:** Determinar la concentración de óxido nítrico y meta-hemoglobina en paquetes globulares que se almacenan en un banco de sangre. **Material y métodos:** Es un estudio observacional y experimental en donde se seleccionaron paquetes globulares del banco de sangre de nuestra institución a los cuales se les determinó la concentración de óxido nítrico y meta-hemoglobina por 30 días consecutivos. Se analizaron los resultados usando la prueba t de Student en el programa estadístico GraphPad Prism V-4. **Resultados:** Los resultados muestran que la concentración de óxido nítrico y meta-hemoglobina se incrementan a lo largo de los treinta días de almacenamiento. En los primeros cinco días, la concentración de óxido nítrico se incrementa en un 96.28% y la meta-hemoglobina en un 159.09%. Dicho incremento se hace más evidente conforme pasa

Abstract

Introduction: The transfusion of erythrocytes can represent a risk for the patient that receives it since can acquire an infection or some alteration to your health because the storage erythrocyte presents an active metabolism. The metabolism can produce harmful substances for the human being. **Objective:** Our objective was to determine in globular package the concentration of nitric oxide and meta-hemoglobin along the time of stored. **Material and methods:** This is an observational and experimental study. Globular packages were selected of the blood bank in our institution. The concentration of nitric oxide and metahemoglobin was determined along 30 days. Results was analyzed with Student «t» test using GraphPad Prism V-4 program. **Results:** Our results show that an increase in nitric oxide and meta-hemoglobin is developed along the time of storage. In the first five days of stored, nitric oxide increased up to 96.28% and meta-hemoglobin increased up to 159.09%. These latter increment in both substances are maintains along the time and is maximum at 30 days of stored. **Conclusions:** The increment in the concentration of nitric oxide and meta-hemoglobin in the globu-

Lista de abreviaciones

ON: óxido nítrico
rpm: revoluciones por minuto
meta-Hb: meta-hemoglobina

www.medigraphic.com

* Jefe del Banco de Sangre, Centro Médico Nacional «20 de Noviembre», ISSSTE.

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

el tiempo, llegando a su punto máximo a los 30 días.

Conclusiones: El incremento en la concentración de óxido nítrico y meta-hemoglobina en los paquetes globulares a lo largo del tiempo puede ser un factor que provoque reacciones adversas en el paciente que recibe una transfusión sanguínea.

Palabras clave: Banco de sangre, meta-hemoglobina, nitratos en sangre, óxido nítrico, paquete globular, transfusión sanguínea.

lar packages along the time can be a factor to produced adverse reactions in the patient that receives a transfusion of blood.

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

Introducción

Se ha descrito que la transfusión de paquetes globulares a un sujeto que padece de una enfermedad determinada puede provocar diversos tipos de alteraciones en su organismo. Así se sabe que, posterior a la transfusión de paquetes globulares, el sujeto receptor suele padecer reacciones a corto, mediano y largo plazo que comprometen seriamente su estado de salud.¹⁻³

Dentro de las reacciones a corto plazo se encuentran las 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.²⁻⁶

De esta forma, la transfusión de un paquete globular es un riesgo potencial para el sujeto que lo recibe, ya que puede contener elementos tóxicos y/o dañinos por venir directamente del donante (virus de la hepatitis, HIV, etc.) o ser originados durante el proceso de almacenamiento de los eritrocitos.²⁻⁷ En este último caso, ha sido reportado que existen diversas sustancias que presentan los paquetes de eritrocitos destinados para transfusión tales como diversos tipos de proteínas leucocitarias, fac-

tores 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 otras muchas cosas más.⁷⁻¹⁴

Por otro lado, se sabe que el óxido nítrico (ON) que se produce en los epitelios de los vasos sanguíneos puede reaccionar químicamente con la hemoglobina de los eritrocitos circulantes, lo que los hace una fuente rica en este metabolito.¹⁵⁻¹⁷ El ON es un metabolito producido en el organismo por la enzima óxido nítrico sintetasa a partir del aminoácido arginina y ejerce un efecto regulatorio en diversos procesos intra y extracelulares tanto fisiológicos como fisiopatológicos. Así, el ON participa de manera importante en la regulación del tono vascular, el impulso nervioso, la activación de plaquetas en la coagulación o durante una septicemia; también en la activación de leucocitos en procesos infecciosos, alteraciones en enfermedades coronarias, diabetes mellitus, hipertensión sistémica, hipertensión pulmonar, prematuridad, entre otras.¹⁸⁻²¹

Tal y como mencionamos en líneas anteriores, el ON que se produce en los epitelios vasculares es capaz de reaccionar químicamente con la hemoglobina de los eritrocitos circulantes ya que posee la capacidad de atrave-

sar las membranas celulares y de esta forma reaccionar con la oxi-hemoglobina formando meta-hemoglobina (meta-Hb) y nitratos totales.²²⁻²⁴ La meta-Hb presenta una menor afinidad por el oxígeno, lo que conduce a una menor oxigenación de los tejidos mientras que los nitratos formados pueden nuevamente, mediante reacciones espontáneas de óxido-reducción con el hierro de la hemoglobina, formar otros compuestos nitrosados que reaccionan con las biomoléculas de la célula y las dañan.²²⁻²⁵

Estas reacciones ocurren en forma espontánea en la circulación sanguínea en donde el eritrocito mantiene un estricto control entre la formación de nitratos totales, la meta-Hb y el ON que existe en el medio que lo circunda.²²⁻²⁵ Sin embargo, ha sido descrito que en condiciones *in vitro* o de éxtasis 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 provoca serias alteraciones locales y/o generales al organismo.¹⁹⁻²⁸

Por lo expuesto con anterioridad, el objetivo del presente trabajo es determinar las concentraciones de ON y meta-Hb en paquetes globulares almacenados en el banco de sangre hasta por treinta días.

Material y métodos

Obtención de paquetes globulares. Los paquetes globulares fueron obtenidos frescos del banco de sangre de nuestra institución y provenían de sujetos masculinos (18-45 años de edad) aparentemente sanos que acudieron como donadores voluntarios. A los sujetos se les llevó a cabo una historia clínica completa junto con una exploración física minuciosa para determinar su estado de salud. La sangre completa fue obtenida por venopunción de acuerdo con la rutina estableci-

da en el banco de sangre y recolectada en un sistema de bolsas de plástico cuádruples (Baxter-Fenwal; Unidad Bolsag con CPD/ADSOL, Opti-System PL-146). Una vez obtenida, la sangre fue centrifugada a 2,000 rpm por 12 minutos para separar los diversos componentes sanguíneos usando el sistema Opti-press (Baxter-Fenwal) el cual separa el plasma y el «buffy coat» de los eritrocitos. Una vez obtenidos los paquetes globulares, fueron colocados en un refrigerador de banco de sangre y mantenidos en refrigeración a 3-7 °C y dejándose bajo las condiciones normales de almacenamiento durante el tiempo que duró el estudio. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a normas y procedimientos establecidos para el manejo de muestras sanguíneas en el banco de sangre y aprobados por nuestra institución.

Obtención de muestras. Una vez obtenido el paquete globular, la bolsa que lo contiene fue puncionada bajo condiciones de esterilidad por una de sus salidas para obtener 10 mL de muestra de eritrocitos. Una vez tomada la muestra, la salida de la bolsa fue sellada para mantener la esterilidad del sistema y el paquete globular se regresó al refrigerador. La toma de muestras de eritrocitos de los paquetes globulares el mismo día de su extracción fue considerada como el tiempo cero y posteriormente se tomaron muestras a los 5, 10, 20 y 30 días de almacenamiento. Todos los procedimientos fueron hechos de acuerdo con las normas y procedimientos oficiales del banco de sangre de nuestra institución, así como los procedimientos y normas que rigen el manejo de productos sanguíneos en humanos.

Lavado de eritrocitos. Los eritrocitos obtenidos de cada muestra fueron procesados el mismo día de acuerdo a los procedimientos generales descritos por Gutiérrez y cols²⁹ y que consisten brevemente en lo siguiente: Los

eritrocitos fueron colocados en un tubo de ensaye y centrifugados 10 minutos a 1,500 rpm en centrífuga clínica. El sobrenadante fue recuperado y reservado para su posterior uso. A los eritrocitos resultantes se les agregaron tres volúmenes de solución salina isotónica fría (NaCl 0.9%) para ser lavados tres veces por centrifugación tal y como fue descrito con anterioridad y por tres veces consecutivas. Una vez obtenidos los eritrocitos, se reservaron para llevar a cabo determinaciones subsiguientes.

Determinación de óxido nítrico. La determinación de óxido nítrico fue realizada en el sobrenadante de los eritrocitos obtenido según la descripción de líneas anteriores. La cantidad de ON presente en las muestras de sobrenadante de eritrocitos se llevó a cabo de acuerdo con la técnica reportada por Cortas y Wakid,³⁰ la cual determina la cantidad total de nitratos como reflejo de la concentración de ON presente en las muestras. En síntesis, la técnica consiste en lo siguiente: Un volumen de sobrenadante de eritrocitos se pasa a través de un filtro de 0.22 mm (Millex-GV, PVDF-durapore, Millipore Co, Bedford MA USA). Al filtrado resultante se le agregan cuatro volúmenes de sulfato de zinc (75 mM) e hidróxido de sodio (55 mM). La mezcla es centrifugada a 5,000 rpm por 10 minutos. A un volumen de sobrenadante resultante se le agrega un volumen de cadmio activado en amortiguador de glicina (0.2 M de glicina ajustado su pH a 9.7 con una solución 2 M de NaOH) y cuatro volúmenes de agua bidestilada, dejándose en agitación constante por 90 minutos. A dos volúmenes de sobrenadante resultantes de la incubación anterior se le agregan 2.5 volúmenes de agua bidestilada y un volumen de sulfanilamida (3% p/v en HCl 0.4N) y de N-naphtiletildiamina (0.1% p/v en agua bidestilada). La mezcla se agita brevemente y se deja incubar 30 minutos al término de los cuales, es leída a 540 nm en un espectrofotómetro tipo Jenway 6300 (Cielovista, Cal. USA).

La concentración de óxido nítrico se reporta como nitratos totales de acuerdo con una curva patrón hecha con concentraciones variables de KNO₃ en el rango μM .³⁰

Determinación de meta-hemoglobina. El porcentaje de meta-hemoglobina (meta-Hb) en las muestras de eritrocitos fue determinado usando el método reportado por Kohn y cols.³¹ usando el hemolizado acuoso de un volumen de eritrocitos. Brevemente, la meta-Hb se determinó como sigue: A un volumen de eritrocitos se le agregaron tres volúmenes de agua bidestilada y se incubaron a 4 °C por 15 minutos. Posteriormente, se colocaron 100 μL de hemolizado en una cubeta (1 mL de capacidad) de cuarzo y se determinó 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 agitó 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.³¹

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

Resultados

La determinación de ON se realiza tomando en cuenta la cantidad total de nitratos presentes en la muestra que se analiza y, de esta forma, se infiere la cantidad total de ON que se

ha formado en la muestra.³⁰ El *cuadro I* muestra el porcentaje de incremento en la cantidad de ON a lo largo del tiempo en muestras de eritrocitos obtenidas de los paquetes globulares almacenados bajo condiciones normales en el banco de sangre y hasta por 30 días.

La cantidad inicial (tiempo cero) de ON (determinado como nitratos totales) fue en promedio de $32.3 \pm 5 \mu\text{M}$, lo que concuerda con la concentración de nitratos totales reportado previamente y presentes en la circulación sanguínea.²²⁻²⁵ Tomando dicho valor como el 100% de nitratos totales presentes en los eritrocitos de los paquetes globulares, se puede observar que se presenta un incremento estadísticamente significativo en la cantidad de óxido nítrico a los 10, 20 y 30 días de almacenamiento, tal como se muestra en el *cuadro I*. Dicho incremento es del 96.28% ($63.4 \mu\text{M}$) con respecto al tiempo cero en los primeros cinco días de almacenamiento y llega a ser del orden del 693.8% ($256.4 \pm 9.8 \mu\text{M}$) a los 30 días de almacenamiento.

Por otro lado, el *cuadro II* muestra el porcentaje de met-Hb en los eritrocitos provenientes de los paquetes globulares almacenados hasta por treinta días. Tal como sucede con el

ON, el porcentaje de met-Hb presente en los eritrocitos muestra un incremento estadísticamente significativo a lo largo del tiempo de almacenamiento. En el *cuadro II* se puede observar que existe un incremento de meta-Hb de 2.59 veces con respecto al tiempo cero (0.57% vs 0.22%; $p < 0.01$) a los cinco días de almacenamiento. Dicho incremento en la concentración de met-Hb en los eritrocitos llega a ser de 10.59 veces sobre el tiempo cero (2.33% vs 0.22%; $p < 0.001$) a los 30 días de almacenamiento del paquete globular.

Discusión

Uno de los productos biológicos más frecuentemente usados en el ámbito clínico como coadyuvante en el tratamiento de diversas patologías que aquejan al ser humano es el paquete globular, el cual se compone de eritrocitos que han sido obtenidos mediante donación voluntaria de sujetos aparentemente sanos. Sin embargo, a pesar de su aparente utilidad, la transfusión de paquetes globulares puede representar un riesgo para la salud del individuo que lo recibe.^{1-5,32}

Cuadro I. Porcentaje de incremento a lo largo del tiempo en la concentración de óxido nítrico (determinado como nitratos totales) en eritrocitos provenientes de paquetes globulares almacenados hasta por treinta días. El porcentaje está expresado como promedio de 12 paquetes globulares.

Tiempo (días)	Óxido nítrico (% incremento)	P*
0	100.00	—
5	96.28	0.01
10	188.73	0.001
20	383.96	0.001
30	693.80	0.001

* vs tiempo cero.

Cuadro II. Concentración de meta-hemoglobina expresada como porcentaje en los eritrocitos provenientes de paquetes globulares almacenados hasta por treinta días. Los resultados están expresados como promedio de 12 paquetes globulares.

Tiempo (días)	% meta-Hb	Incremento*	P**
0	0.22	—	—
5	0.57	2.59	0.01
10	0.87	3.96	0.001
20	1.44	6.54	0.001
30	2.33	10.59	0.001

* veces sobre el valor a tiempo cero.

** vs tiempo cero.

meta-Hb: meta-hemoglobina.

D.E.: desviación estándar.

Ha sido demostrado que, una vez que ha sido obtenido y almacenado bajo estrictas normas de seguridad, un paquete globular puede presentar una gran cantidad de compuestos que potencialmente representan un riesgo para la salud del sujeto que lo recibe. Dentro de ellos se encuentran virus, factores de crecimiento, derivados leucocitarios, así como productos del metabolismo del eritrocito que, al no encontrar salida, se van acumulando dentro de la bolsa que los contiene y que son el reflejo de la actividad metabólica que presenta el eritrocito aun a bajas temperaturas.^{6-14,32-34} Como ejemplo de lo anterior, se ha descrito que a lo largo del tiempo de almacenamiento, el paquete globular puede contener 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}

Dichas sustancias pueden ser el reflejo del metabolismo normal del eritrocito durante el tiempo que permanece almacenado o el resultado del deterioro normal que sufre el eritrocito a lo largo del tiempo. En cualesquiera de los dos casos anteriores, el resultado neto es la acumulación de elementos potencialmente tóxicos para quien los recibe cuando se le instala una transfusión de paquetes eritrocitarios, ya que, a diferencia de los virus, este tipo de sustancias no son detectadas rutinariamente en el banco de sangre.

Una de estas sustancias es el óxido nítrico (ON) que se encuentra en los eritrocitos de la circulación sanguínea y que acompaña a los eritrocitos de un paquete globular. Lo anterior está sustentado en el hecho de que nuestros resultados demostraron que, a tiempo cero, los eritrocitos de los paquetes globulares presentan una concentración de ON semejante a la encontrada en la circulación sanguínea. Una vez que el ON se encuentra en el eritroci-

to, éste puede reaccionar con la hemoglobina formando meta-Hb y nitratos totales, tal como ha sido descrito para experimentos hechos *in vitro*.^{15-17,22-28}

En condiciones normales, el porcentaje de meta-Hb presente en los eritrocitos no es superior al 0.3% mientras que la concentración de nitratos fluctúa alrededor de 25-45 μM en el plasma fresco humano.^{15-17,22-28,35} De acuerdo con nuestros resultados, conforme pasa el tiempo de almacenamiento de los paquetes globulares, ambos metabolitos se acumulan gradualmente, llegando a presentar cantidades muy superiores a las que se encuentran en la circulación sanguínea (*Cuadros I y II*).

El origen exacto de la gradual acumulación de ON y meta-Hb en los paquetes globulares a lo largo del tiempo debe ser investigado; sin embargo, podemos suponer que dichos metabolitos se pueden formar gracias a un proceso de reacción espontánea llevado a cabo por radicales libres, ya sea derivados del oxígeno y/o el nitrógeno, tal como sucede en otro tipo de sistemas.^{23,35-40}

Como mencionamos con anterioridad, se ha comprobado en experimentos hechos *in vitro* que el ON presente en el medio puede reaccionar espontáneamente con la hemoglobina del eritrocito y formar meta-Hb y nitratos. Una vez que se han formado nitratos como producto de esta reacción, se llevan a cabo reacciones de óxido-reducción espontáneas llevadas a cabo entre estos nitratos y el hierro contenido en la hemoglobina de los eritrocitos, lo que genera como subproducto más ON en el medio.^{15-17,22-28,35-39} De esta forma, podemos hipotetizar que estas reacciones de óxido-reducción espontáneas descritas con anterioridad pueden ser una fuente de generación de ON en la bolsa que contiene al paquete globular, lo que hace que este metabolito reaccione nuevamente con la hemoglobina y que, con el tiempo, tenga una acumulación

progresiva de meta-Hb y nitratos como hemos observado.

Puesto que la concentración de hemoglobina en un paquete de eritrocitos es prácticamente infinita, se establece un círculo de oxidación-reducción en donde el resultado final es la acumulación progresiva de met-Hb y ON. La acumulación de estos dos metabolitos en el paquete globular puede ser altamente riesgosa para el paciente que lo recibe ya que tanto la met-Hb como los nitratos pueden provocar hipoxia (en el primer caso) o alteraciones generales (en el segundo caso) relacionadas con los procesos fisiológicos normales del individuo.^{33-35,39,40}

Conclusiones

Como medida terapéutica, la transfusión sanguínea ha probado tener excelentes resultados ya que ofrece un soporte fisiológico como medida de oxigenación de los tejidos en diversas patologías agudas o crónicas que aquejan al ser humano. Sin embargo, la transfusión de eritrocitos no carece de riesgo para el receptor ya que, durante el tiempo de almacenamiento, un paquete globular puede generar una serie de compuestos químicos muy reactivos que potencialmente afectan los procesos fisiológicos del organismo.

Los eritrocitos obtenidos de donantes sanos y almacenados bajo condiciones óptimas en un banco de sangre tienden a presentar diversos cambios a nivel metabólico y estructural, por lo que su prolongado almacenamiento 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 fresco posible para que, de esa forma, se evite la entrada de sustancias dañinas tales como la met-Hb y los nitratos que pueden comprometer aún más su estado de salud.

Referencias

- Rodríguez MH. TRALI: daño pulmonar agudo por transfusión. *Rev Med IMSS* 2004; 42 (6): 501-6.
- García-Escamilla RM, Méndez-López TIA. Reacciones adversas por transfusión sanguínea en pacientes cardiopatas. *Rev Mex Patol Clin* 2006; 53 (3): 139-45.
- Barba EJR. Transfusión de sangre y sus componentes: riesgos, beneficios e indicaciones. *Rev Mex Patol Clin* 2004; 51 (2): 97-118.
- Nielsen HJ. Detrimental effects of perioperative blood transfusion. *Bri J Surg* 1995; 82: 582-7.
- Gupta SC, Shaw A. Evaluation of single unit red cell transfusions given to adults during surgery. *Asian J Transf Sci* 2007; 1: 12-5.
- Szpisjak D, Edgell DS, Bissonnette B. Potassium as a surrogate marker of debris in cell-salvaged blood. *Anesth Analg* 2000; 91: 40-3.
- 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: 107-11.
- Nielsen HJ, Werther K, Mynster T, Brünner N. Soluble vascular endothelial growth factor in various blood transfusion components. *Transfusion* 1999; 39: 1078-83.
- Weisbach V, Wanke J, Zingsem R, Zimmermann R, Eckstein R. Cytokine generation in whole blood, leukocyte-depleted and temporarily warmed red blood cells concentrates. *Vox Sanguinis* 1999; 76: 100-6.
- Nishiyama T, Hanaoka K. Free hemoglobin concentration in patients receiving massive blood transfusion during emergency surgery for trauma. *Can J Anesth* 2000; 47: 881-5.
- Sezdi M, Bayik Y, Ulgen Y. Storage effects on the coagulation parameters of erythrocyte suspensions. *Physiol Meas* 2006; 27: 623-35.
- 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): 351-6.
- 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: 357-63.
- 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: 1270-6.
- 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.
- 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.
- Nagababu E, Ramasamy S, Abernethy DR, Rifkind JM. Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. *J Biol Chem* 2003; 278: 46349-56.
- Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53 (4): 503-14.
- Stankevicius E, Kévelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicine* 2003; 39 (4): 333-41.

20. Bred DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann Rev Biochem* 1994; 63: 175-95.
21. Tuteja N, Chandra M, Tujeda R, Misra MK. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *J Biomed Biotech* 2004; 4: 227-37.
22. Denicola A, Souza JM, Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3566-71.
23. 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.
24. Rodkey FL. A mechanism for the conversion off oxyhemoglobin to methemoglobin by nitrite. *Clin Chem* 1976; 22 (12): 1986-1990.
25. Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature* 2001; 409: 622-6.
26. Noble DR, Williams DLH. Nitrosation products from S-nitrosothiols via preliminary nitric oxide formation. *J Chem Soc Pekin Trans* 2002; 2: 1834-8.
27. Gow AJ, Stamler JS. Reaction between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 1998; 391: 169-73.
28. Gow AJ, Luchsinger BP, Pawloski JR, Singel DJ, Stamler JS. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9027-32.
29. 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: 263-70.
30. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 38: 1440-3.
31. Kohn MC, Melnick RL, Ye F, Portier CJ. Pharmacokinetic of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. *Drug Metabolism and Disposition* 2002; 30: 676-83.
32. Hardy JF, Bélisle S. Erythrocyte transfusion: friend or foe? *Can J Anesth* 2001; 48 (6): 1-7.
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: 164-70.
34. Meyerstein N, Mazor D, Dvilansky. Erythrocyte agglomeration and survival studies in citrate-phosphate-dextrose (CPD) units. *J Ann Hematol* 1979; 39 (3): 211-6.
35. Han TH, Hyduke DR, Vaughn MW, Fukuto JM, Lisao JC. Nitric oxide reactions with red blood cells and hemoglobin under heterogeneous conditions. *ProProc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7763-8.
36. Gutiérrez-Salinas J. Función de los complementos antioxidantes durante el ejercicio. *Med Int Mex* 2007; 23: 217-22.
37. Gutiérrez-Salinas J. ¿Qué sabe usted acerca de...radicales libres? *Rev Mex Cien Farm* 2006; 37: 69-73.
38. Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA. Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. *Med Int Mex* 2004; 20: 287-95.
39. Deepa DKV, 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.
40. Gladwin MT, Schechter AN. NO contest: Nitrite versus S-nitroso-hemoglobin. *Circ Res* 2004; 94: 851-5.

Correspondencia:

Dr. José Gutiérrez Salinas

Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental,
División de Investigación Biomédica,
Centro Médico Nacional «20 de Noviembre», ISSSTE,
San Lorenzo Núm. 502, 2º piso, Col. Del Valle,
03100, México D.F.
Tel.: 5200-5003, ext. 14603
Fax: 5559-3256.
E-mail: quauhtlicutli@yahoo.com