

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

HOSPITAL UNIVERSITARIO “VIRGEN DE LAS NIEVES”:
UNIDAD DE NUTRICION CLÍNICA Y DIETÉTICA

FUNDAMENTACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE
ANDALUCÍA ORIENTAL – ALEJANDRO OTERO

ESTRÉS OXIDATIVO Y SU RELACIÓN CON EL APORTE
DE ANTIOXIDANTES NUTRICIONALES EN EL
PACIENTE CRÍTICO

MEMORIA que presenta para aspirar al Grado de Doctor por la
Universidad de Granada de Dna. Jimena Soledad Abilés

INDICE

I. Antecedentes bibliográficos.....	1
Introducción	2
1. Estrés oxidativo.....	4
1.1. Especies reactivas	4
1.2. Fuentes celulares de especies reactivas de oxígeno.....	7
1.3. Daño oxidativo celular.....	7
1.3.1. Mecanismos de peroxidación lipídica.....	8
1.3.2. Mecanismos de oxidación proteica.....	11
1.3.3. Otros mecanismos de oxidación: molécula de ADN.....	12
1.4. Sistemas de defensas celulares frente a las especies reactivas de oxígeno.....	12
1.4.1. Mecanismo de neutralización de las especies reactivas de oxígeno.....	13
1.4.2. Antioxidantes nutricionales.....	16
1.4.3. Necesidades nutricionales.....	21
2. Implicaciones del EO en situaciones patológicas.....	25
2.1. El paciente crítico y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.....	26
2.1.1. Fases de la respuesta sistémica a la agresión.....	26
2.1.2. Componentes de la respuesta sistémica a la agresión.....	29
2.1.3. Alteraciones metabólicas de la respuesta sistémica a la agresión.....	31

2.1.4. Mecanismos y vías de producción de especies reactivas de oxígeno en el paciente crítico.....	33
2.1.2. Efecto de la hiperhomocisteinemia en el endotelio vascular.....	36
2.2.2. Déficit de micronutrientes en pacientes críticos.....	38
3. Especies reactivas de oxígeno y enfermedad grave. Revisión de la evidencia	41
3.1. Estudios de biomarcadores estrés oxidativo	41
3.2. Estudios de suplementación antioxidante en el paciente crítico	43
II Hipótesis y objetivos	47
III Material y métodos	49
1. Diseño del estudio	50
2. Población objeto de estudio y selección de la muestra	51
2.1. Pacientes del estudio.....	51
2.2. Selección de pacientes y criterios de inclusión.....	51
2.3. Tipo de muestreo.....	51
2.3.1. Tamaño muestral y descripción de la muestra.....	52
3. Valoración clínica y nutricional	52
3.1. Historia clínica.....	52
3.2. Valoración de la presencia de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.....	53
3.3. Valoración de la gravedad.....	53
3.4. Valoración de grado de estrés metabólico.....	54
3 5. Valoración de la ingesta	56
3.5.1. Cuantificación de la ingesta.....	56
3.5.2. Ajuste de la ingesta.....	56

4. Determinaciones y técnicas analíticas.....	57
4.1. Toma de muestra.....	57
4.2. Determinaciones bioquímicas generales.....	58
4.3. Valoración del estrés oxidativo.....	60
4.3.1. Grupos carbonilos.....	61
4.3.2. Hidroperóxidos lipídicos.....	61
4.3.3. Capacidad antioxidante total.....	62
5. Análisis estadístico de los datos.....	62
IV Resultados.....	64
1. Características de la muestra	65
2. Ingesta de energía y nutrientes.....	66
3. Ajuste de la ingesta media a las recomendadas	68
4. Cambios en variables clínicas.....	71
5. Cambios en los biomarcadores de estrés oxidativo.....	72
6. Análisis de regresión lineal.....	73
7. Análisis bivariado y regresión logística.....	75
V. Discusión.....	83
1. Sobre la ingesta de energía y nutrientes y su ajuste a las recomendaciones.....	84
....1.1 Energía y proteínas.....	84
....1.2. Micronutrientes.....	85
2. Sobre los biomarcadores de estrés oxidativo.....	86
2.1 Peróxidos lipídicos.....	87
2.2. Grupos carbonilos.....	87
2.3. Capacidad antioxidante total.....	88

3. Sobre las variables clínicas.....	89
3.1. Homocisteína plasmática.....	89
4. Sobre la morbilidad y su asociación con el estrés oxidativo, ingesta suficiente de antioxidantes e hiperhomocisteinemia.....	91
VI. Conclusiones.....	95
VI. Bibliografía.....	98

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

INTRODUCCIÓN

Los seres humanos y la mayoría de los organismos eucarióticos necesitan el oxígeno para mantener una producción de energía suficiente para sobrevivir. Sin embargo, el oxígeno es potencialmente peligroso, principalmente debido a la formación de especies reactivas intermedias durante su utilización. Esto es lo que se denomina la *paradoja aerobia*.

En la protección de las células contra la oxidación actúan diferentes niveles de defensa antioxidantes en los que participan enzimas, moléculas secuestrantes de electrones y nutrientes.

En el organismo existe un equilibrio entre las especies reactivas de oxígeno y los sistemas de defensa antioxidante. Cuando dicho equilibrio se descompensa a favor de las especies reactivas de oxígeno se produce el denominado estrés oxidativo (EO).

El estrés oxidativo puede originarse por dos situaciones:

- Disminución de antioxidantes debido a la malnutrición (por ejemplo, por ingesta dietética insuficiente de alfa-tocoferol, ácido ascórbico o aminoácidos azufrados necesarios para la generación de glutathion).
- Producción excesiva de especies reactivas de oxígeno por ejemplo, exposición a altas concentraciones de oxígeno o a radiaciones, elevada concentración de contaminantes o excesiva activación de los sistemas naturales productores de radicales (en enfermedades crónicas inflamatorias como artritis reumatoide o situaciones agudas en las que se desencadena una respuesta inflamatoria sistémica como en la enfermedad grave).

Las células pueden tolerar estados de EO leve; sin embargo, situaciones severas de estrés oxidativo pueden afectar al metabolismo celular: a través de la rotura de moléculas de ADN, del aumento de la concentración de calcio intracelular, del daño a proteínas y/o de peroxidación de lípidos.

Durante la enfermedad grave muchos factores pueden combinarse para incrementar drásticamente la producción de radicales libres y su consecuente daño a los tejidos: la elevación de la concentración de oxígeno por compromiso respiratorio, el tratamiento con óxido nítrico, el daño por isquemia/reperfusión y sus consecuencias, el empeoramiento de la función renal que lleva a la disminución de depuración de sustancias que pueden ser pro-oxidantes, el desequilibrio de fluidos y electrolitos, etc. Además de la pérdida masiva de antioxidantes agravada por la nutrición insuficiente.

Hay una clara evidencia de que una normalización de la capacidad antioxidante del organismo es una estrategia terapéutica en el tratamiento del paciente crítico. El aporte adecuado de nutrientes antioxidantes en estos pacientes sigue siendo un desafío, quedando aún por determinar cuales son las necesidades reales y las dosis efectivas de los mismos.

1. ESTRÉS OXIDATIVO

1. 1.Especies reactivas

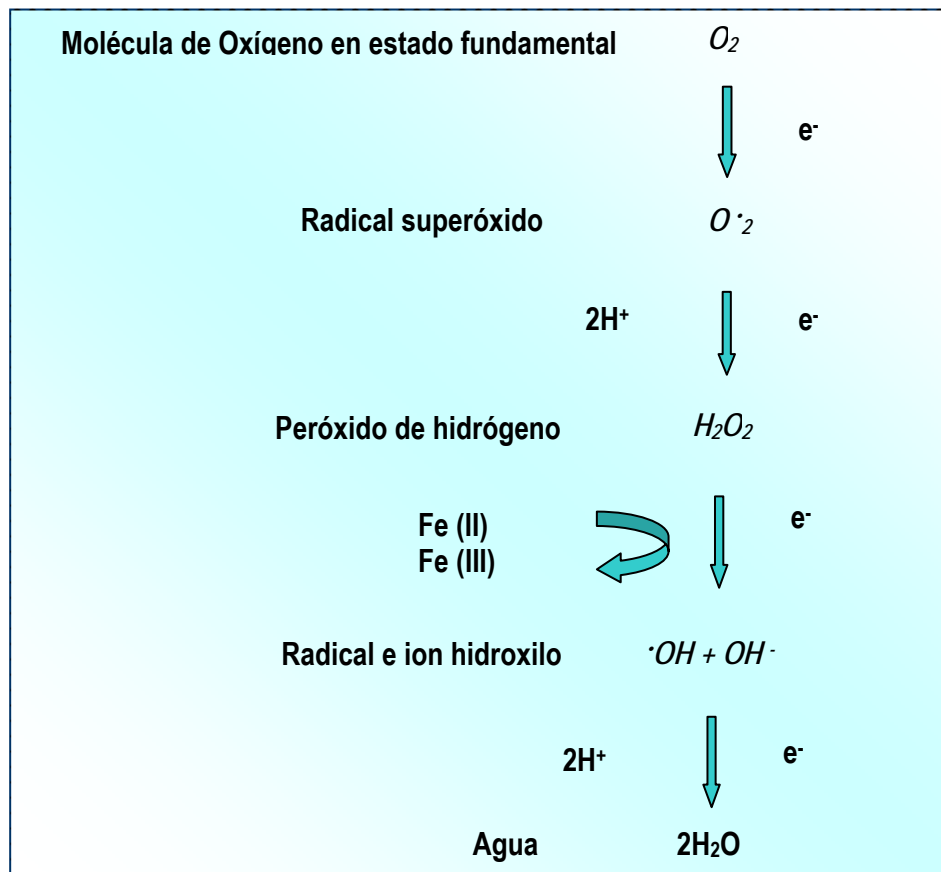
Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su última capa, lo que les permite reaccionar con un elevado número de moléculas de todo tipo, primero oxidándolas y después atacando sus estructuras. Dentro de este concepto genérico, las formas parcialmente reducidas del oxígeno se denominan Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), ya que generalmente son más reactivas que la molécula de oxígeno en su estado fundamental. Es un término global que incluye tanto especies radicales como especies no radicales de oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (1, 2,3).

La producción de la energía necesaria para los diferentes procesos celulares requiere oxígeno, el cual es finalmente reducido a agua tras aceptar cuatro electrones por acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial. Normalmente, el 2% del oxígeno es reducido en forma incompleta al aceptar un menor número de electrones, originando compuestos intermedios inestables, denominadas especies reactivas de oxígeno (4, 5). (Figura 1).

La incorporación de un electrón a la molécula de oxígeno, la activa y origina el **radical anión superóxido** ($O_2^{\cdot-}$), que sólo presenta un electrón desapareado. Se forma en cualquier sistema capaz de generar electrones libres en donde se encuentre la molécula de oxígeno. Es producido por macrófagos, neutrófilos, leucocitos, fibroblastos y células del endotelio vascular (3, 6, 7). Se trata de un radical poco reactivo, aunque es capaz de oxidar grupos tioles y ácido ascórbico y ha sido implicado en procesos que se acompañan de amplias lesiones como la lesión por reperfusión tras un período de isquemia (3).

Su ácido conjugado, el radical hidroperóxido ($\text{HO}\cdot_2$), es mucho más reactivo frente a moléculas de importancia biológica, siendo capaz de iniciar la peroxidación lipídica (2-5). Sin embargo, es casi inexistente a pH fisiológico. Su importancia radica en la formación de una especie aún mucho más reactiva, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a través de una reacción no catalizada o de una reacción de dismutación catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Esta molécula es un moderado agente oxidante frente a la mayoría de compuestos orgánicos (6).

Figura 1. Metabolismo del oxígeno molecular hasta el agua



Fuente: Adaptación de John Dryden (2000)

El O_2 se metaboliza al final de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, donde los electrones y protones que han completado el proceso de transporte se acumulan. Para una reducción completa del oxígeno molecular hasta el agua es necesario añadir 4 electrones (e^-) y 4 protones (H^+). En la primera reacción se añade un electrón al oxígeno y se produce el radical superóxido ($\text{O}\cdot_2$). La adición de un electrón al superóxido crea el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual se dismuta y forma un radical hidroxilo y un ion hidroxilo ($\cdot\text{OH} + \text{OH}^-$), mediante una reacción catalizada por el hierro en su forma reducida (Fe (II)).

En presencia de metales de transición en estado reducido como Fe (II), Cu (I), Co (II) y Ni (II), la especie (H_2O_2), es transformada en otra mucho más reactiva, el radical hidroxilo (HO^\bullet), a través de la reacción de Haber-Weiss o Fenton. El radical anión hidroxilo (HO^\bullet) es uno de los agentes oxidantes conocidos más potentes y puede oxidar casi cualquier molécula biológica (8, 9, 10).

Además de por la generación de ERO, el daño oxidativo puede agravarse o inhibirse por las especies reactivas de nitrógeno (ERN) (11), incluyendo el óxido nítrico (ON^\bullet), peroxinitrito ($ONOO^\bullet$), entre otros, los cuales pueden inducir un daño *per se* o combinarse con las ERO para aumentar o atenuar el daño oxidativo.

El peroxinitrito ($ONOO^\bullet$) es un potente oxidante, mas citotóxico que el óxido nítrico (ON^\bullet), que estimula diferentes procesos proinflamatorios, incluyendo la expresión intracelular de moléculas de adhesión, interleucinas (IL 8) y el factor nuclear-Kb (NF-Kb) (12).

En los neutrófilos, el metabolismo del oxígeno posee una vía adicional, que emplea una enzima mieloperoxidasa para clorar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) dando ácido hipocloroso $HOCL$. Cuando se activan los neutrófilos, la conversión del oxígeno en superóxido aumenta veinte veces. En situaciones de hipermetabolismo, cerca del 40% del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se desvía hacia la producción de hipoclorito y el 60% restante forma radicales hidroxilo (HO^\bullet). El hipoclorito es un potente germicida y requiere solo milisegundos para producir un daño letal a las bacterias (13,14).

El **estrés oxidativo** (EO) es la consecuencia de un desequilibrio entre la producción de especies oxidantes, que son principal pero no exclusivamente especies derivadas del oxígeno y pueden ser radicales libres o no radicales y su neutralización por los antioxidantes (15).

1.2. Fuentes productoras de especies reactivas de oxígeno

Se han descrito numerosos sistemas biológicos capaces de generar radicales libres *in vivo*: enzimas como la NADPH oxidasa y proteínas como xantina oxidasas, pequeñas moléculas como tioles o flavoproteínas y organelas celulares como mitocondrias, cloroplastos y membrana plasmática (5, 7).

Además de los sistemas intracelulares, existen fuentes exógenas productoras de especies reactivas de oxígeno, tales como la exposición a radiación electrónica y rayos X (16), exposición a la contaminación ambiental, humo de tabaco e hidrocarburos halogenados (17).

1.3. Daño oxidativo celular

El metabolismo aerobio implica la producción de especies reactivas de oxígeno incluso en condiciones basales. Estas atacan todo tipo de moléculas biológicas, incluyendo sustratos lipídicos, carbohidratos, proteínas y ADN, induciendo su oxidación. Como consecuencia se originan nuevos radicales libres capaces de reaccionar con otras moléculas (17). Por tanto, en las células y organismos hay un continuo requerimiento de antioxidantes para la inactivación de estas especies.

El EO está asociado con procesos degenerativos como mutagénesis, carcinogénesis, alteraciones en membranas, peroxidación lipídica, oxidación y fragmentación proteica, así como alteraciones en carbohidratos (7, 18, 19).

Se han desarrollado numerosos métodos para monitorizar el EO *in vivo*. En la actualidad es posible la cuantificación directa de ERO mediante resonancia o su determinación indirecta, a través de la detección de “biomarcadores” de EO: subproductos del ataque oxidativo en los lípidos (*sustancias que reaccionan con el ácido*

tiobarbitúrico, 4-hidroxinonenal, peróxidos lipídicos, LDL oxidada, isoprostanos F₂), medida del daño en ADN (*8-hidroxi-2'-deoxiguanosina* y su base libre *8-hidroxi-guanina*) o en proteínas (*grupos hidroxilo o carbonilo*), o por la determinación de antioxidantes endógenos y la capacidad antioxidante, por ejemplo el “*total radical trapping antioxidant parameter*” (TRAP) (20).

El término “biomarcadores” ha sido adaptado de la epidemiología molecular para describir los cambios moleculares derivados del ataque por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno a las moléculas biológicas.

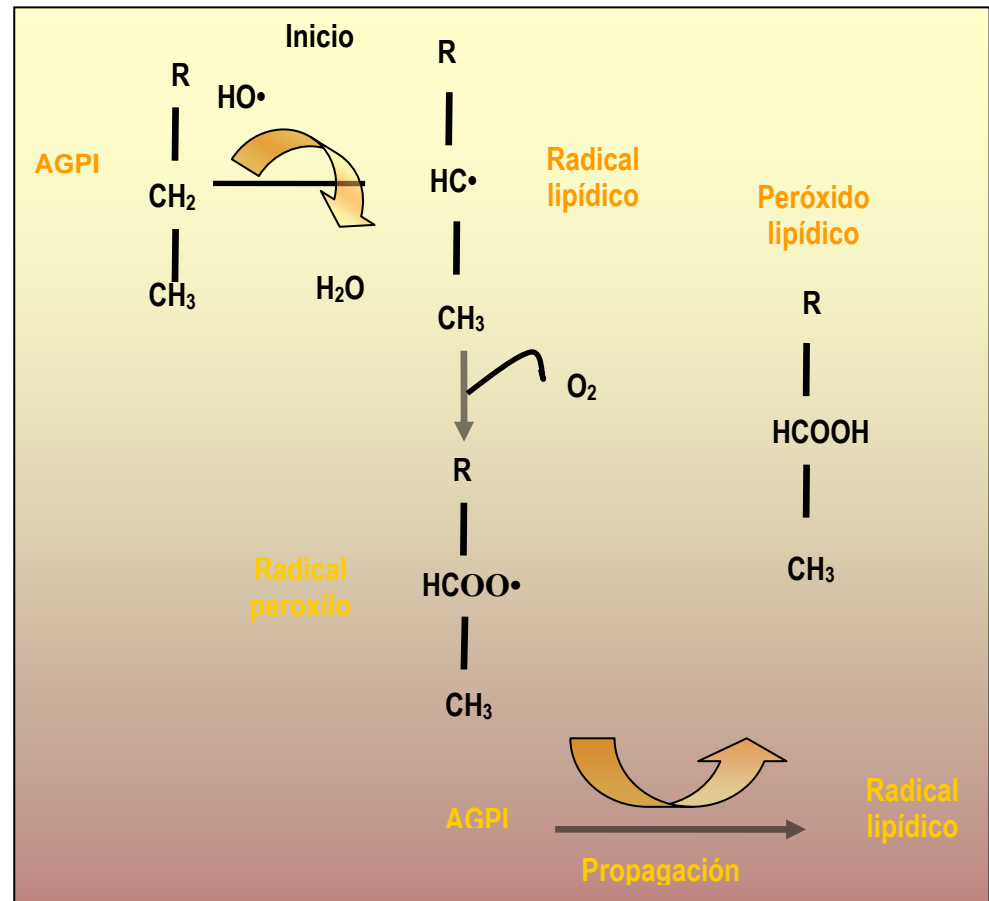
1.3.1. Mecanismos de peroxidación lipídica

Una de las biomoléculas más sensibles al ataque de las ERO son los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), cuya lesión oxidativa se denomina peroxidación lipídica (Figura 2) y que resulta especialmente relevante cuando se afectan los lípidos constitutivos de las membranas biológicas, ya que se ven alteradas propiedades como la fluidez, el potencial y la permeabilidad iónica de la membrana (21), conduciendo finalmente a una pérdida de la integridad de la misma (22, 23).

Además, también se pueden alterar proteínas funcionales tales como transportadores y enzimas (24,25), provocando roturas que liberan el contenido de las células y organelas, como las enzimas hidrolíticas lisosomales (26, 27). Los peróxidos lipídicos (**LOOH**) y/o sus derivados carbonílicos citotóxicos pueden bloquear la acción de los macrófagos, inhibir la síntesis de proteínas, destruir bacterias, inactivar enzimas, agregar proteínas, generar trombinas y actuar como agentes quimiotácticos para los fagocitos (28- 30).

Por otra parte, está ampliamente descrito que los productos finales de la peroxidación lipídica, tales como malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-nonenal (HNE) y peróxidos lipídicos producen lesiones en las proteínas, al interactuar con restos de lisina, cisteína e histidina (31-34). Estas interacciones producen alteraciones graves en las proteínas, hecho que ha sido corroborado tanto en experimentos *in vivo* (35, 36) como *in vitro* (37-39).

Figura 2. Secuencia de la reacción para la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en las membranas celulares.



Fuente: Adaptación de Jon Dryen (2000)

La secuencia de la reacción se inicia por la acción de un oxidante enérgico, como el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), que extrae un átomo entero de hidrógeno (electrón y protón) de uno de los átomos de carbono de un ácido graso poliinsaturado (AGPI). Ello crea un radical con centro carbono ($\text{C}\cdot$), que luego se transforma en un radical peroxi con centro de oxígeno ($\text{COO}\cdot$), el cual a su vez puede extraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso adyacente e iniciar así una reacción en cadena autoalimentada, que prosigue hasta que se agote el sustrato, es decir, se agote el ácido graso o algo interfiera en la reacción de propagación.

La detección y medida de la peroxidación lipídica ha sido muy utilizada en el estudio de la influencia del estrés oxidativo en distintas patologías (40).

Para determinar el grado de oxidación lipídica de un tejido se puede cuantificar el contenido en sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) (41). Sin embargo, la medida de TBARS puede resultar bastante imprecisa como indicador de la peroxidación de lípidos, ya que el MDA que forma aductos con el ácido tiobarbitúrico, no solo se deriva de reacciones de este tipo (42), lo cual produce una sobreestimación de la medida.

En los últimos siete años, se ha descrito un método exacto para la determinación directa del contenido en lipoperóxidos, mediante la reacción de los mismos con un exceso de ion ferroso (Fe^{2+}) a pH ácido en presencia del colorante "xilenol orange" (XO) (43). La cantidad de ion férrico (Fe^{3+}) generado se puede medir en función de la cantidad de complejo Fe-XO formado. Este método se conoce como FOX y está ampliamente reconocido para determinar la peroxidación lipídica (43, 44).

Más recientemente se está empezando a utilizar los isoprostanos F_2 , isómeros de las prostaglandinas que se producen como productos finales de la peroxidación del ácido araquidónico mediado por ERO, siendo el más utilizado el 8-epiPGF₂a (45).

Otro posible índice de peroxidación lipídica es la determinación de gases volátiles, particularmente etano y pentano exhalados en el aliento, productos de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y ω -6 respectivamente (45).

1.3.2. Mecanismos de oxidación proteica

La modificación oxidativa de proteínas está asociada a ciertos procesos fisiológicos y patológicos.

Aminoácidos, péptidos y proteínas son susceptibles de ser sustrato de radicales libres o especies reactivas oxidantes. Como se explicó anteriormente, las ERO pueden oxidar directamente las proteínas o bien originar derivados oxidados de tipo lipídico o glucídico que reaccionan con los grupos funcionales de las proteínas (46-49).

Una primera etapa implica la oxidación de los residuos aminoácidos de la proteína por la acción de un sistema oxidante. Modificación que conlleva una desaminación o decarboxilación del aminoácido proteico, además de generar fenómenos de pérdida de actividad de la proteína por una progresiva desnaturalización, un incremento de la hidrofobicidad y/o una agregación de proteínas (50).

Entre las modificaciones oxidativas que pueden sufrir los diferentes aminoácidos en las proteínas figuran la formación de bitirosina (51, 52) y compuestos carbonilo (53), que son uno de los productos finales de oxidación de proteína más ampliamente estudiados. Lisina, arginina, prolina e histidina son los aminoácidos con mayor tendencia a la modificación oxidativa por formación de compuestos carbonilo (53).

El contenido en carbonilos de las proteínas puede ser usado como medida del daño producido en las mismas por procesos de oxidación (54, 55). Hasta la fecha, se han desarrollado diversos procedimientos muy sensibles para la detección y cuantificación de grupos carbonilos (56, 57), siendo el más utilizado el método en el que se emplea el reactivo 2,4-

dinitrofenilhidrazina (DNPH) que se conjuga con los carbonilos dando lugar a un compuesto que se mide espectrofotométricamente.

1.3.3. Otros mecanismos de oxidación: molécula de ADN

Las especies reactivas de oxígeno pueden atacar la molécula de ADN, promoviendo el desarrollo de procesos cancerígenos a través de diversos mecanismos: efecto en la proliferación celular (58), daño en enzimas de sistemas reparadores (59) y unión de productos de peroxidación lipídica a moléculas de ADN, determinando cambios mutagénicos (60). Además, la lesión oxidativa del ADN puede inducir mutagénesis espontáneas (61, 62).

Se ha demostrado que la formación de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) y su base libre (8-hidroxi-guanina) son indicadores de la lesión oxidativa y la determinación en orina puede ser un marcador útil de la lesión del ADN (63).

1.4. Sistemas de defensa frente a las especies reactivas de oxígeno

Los organismos aerobios poseen mecanismos para neutralizar los radicales libres, los cuales se están produciendo continuamente en el metabolismo, en pequeñas cantidades. Además las células disponen de sistemas enzimáticos complejos y secuestradores químicos que previenen el daño oxidativo (64).

El exceso de ERO se inactiva por moléculas antioxidantes (AOX) endógenas y exógenas que tienen la capacidad, siempre a bajas concentraciones, de retrasar o inhibir la oxidación de un sustrato (64).

1.4.1. Mecanismos de neutralización de las ERO

Las estructuras críticas en la célula son protegidas por la capacidad de varios tipos de AOX y también por otros mecanismos como los de reparación o eliminación del daño por enzimas específicas.

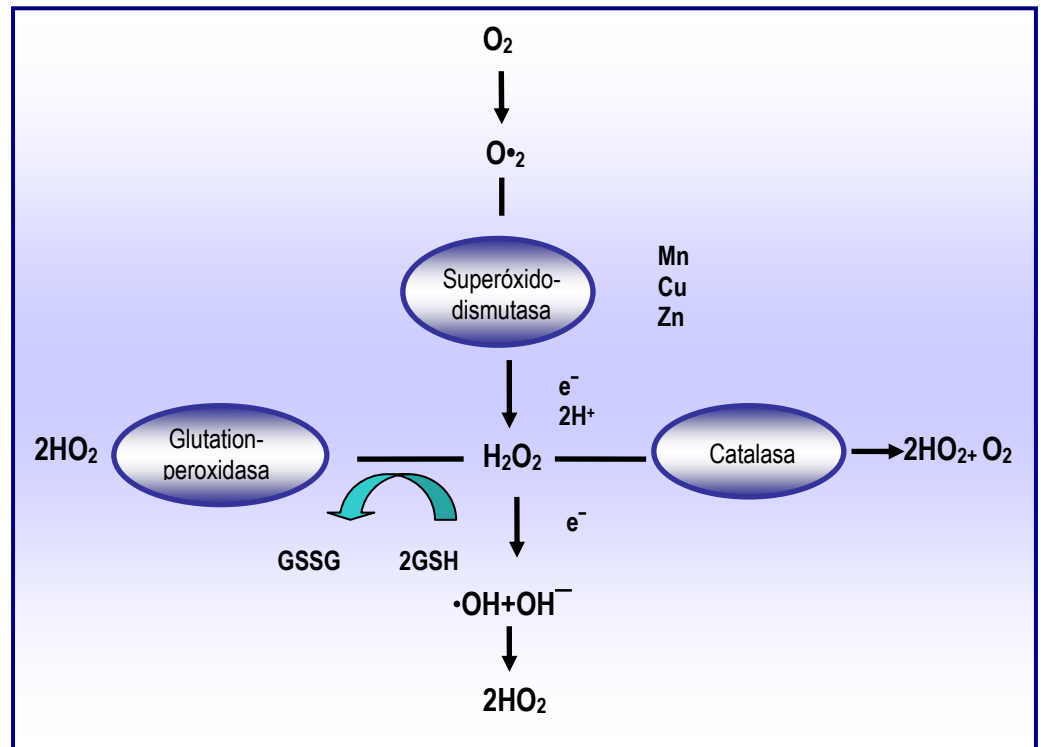
Las enzimas constituyen la primera línea de defensa celular frente al daño oxidativo. En general, funcionan eliminando $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 antes de que interactúen para formar el radical OH^{\cdot} . Pero existe una segunda línea de defensa compuesta por secuestradores no enzimáticos, que actúan sobre los radicales libres residuales que escapan a las enzimas antioxidantes (65).

Los antioxidantes se pueden agrupar según su naturaleza química y su modo de acción en:

A) Enzimas AOX, que actúan sobre ERO específicas degradándolas a moléculas menos nocivas (Figura 3).

Los mecanismos de inactivación de las ERO incluyen etapas sucesivas. El proceso se inicia con la dismutación del superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), bajo la influencia de la **Superóxido Dismutasa (SOD)**. La SOD es una enzima distribuida en todo el organismo. Hay dos tipos intracelulares de SOD: la que está presente en la mitocondria, que contiene manganeso en su centro activo (Mn-SOD) y la del citosol, que tiene iones de cobre y zinc (Cu-Zn-SOD). También existe la SOD extracelular (66).

Figura 3. Descripción esquemática del mecanismo de producción y neutralización de ERO



La secuencia de la reacción reproduce el metabolismo del oxígeno. Los cofactores para la superóxido-dismutasa son el manganeso (Mn), el cobre (Cu) y el zinc (Zn), pero nunca están presentes como una triada en la misma enzima. El cofactor para la glutación-peroxidasa es el selenio (Se). GSH, glutación reducido; GSSG, glutación oxidado como dipéptido.

Posteriormente, **Catalasa** y **Glutación Peroxidasa (GPx)** actúan convirtiendo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (66).

La Catalasa es una enzima intracelular que se localiza en el interior de los glóbulos rojos. El equilibrio entre la actividad de la Catalasa respecto de SOD es fundamental para mantener el balance REDOX (64)

La GPx es un complejo enzimático. Existen cuatro formas diferentes de esta enzima y todas ellas tienen selenio en su centro activo. La GPx celular elimina el (H_2O_2) formado por las SOD, transformando el glutación reducido (GSH) en glutación disulfuro oxidado (GSSG). La GPx gastrointestinal es una

enzima intracelular que actúa de manera similar que la anterior y podría metabolizar los hidroperóxidos absorbidos de la dieta. La GPx plasmática o extracelular reduce hidroperóxidos esterificados en los fosfolípidos e hidroperóxidos libres. Por último, la fosfolípido-hidroperóxido-glutatión peroxidasa se encuentra en el citosol y en las membranas celulares, siendo la única forma intracelular que puede reducir los hidroperóxidos de los ácidos grasos esterificados de los fosfolípidos (66)

La glutatión reductasa regenera el GSH a partir de GSSG, transfiriendo los equivalentes reductores del NADPH.

B) AOX preventivos, que secuestran a los iniciadores del proceso oxidativo tales como los metales de transición hierro (Fe) y cobre (Cu), los cuales contienen un electrón desapareado y aceleran fuertemente la formación de ERO.

Dentro de este grupo se encuentran:

- *Transferrina y lactoferrina*: son glucoproteínas que ligan el Fe y lo transportan en la circulación sanguínea. La ferritina almacena este metal intracelularmente (67,68, 69).

- *Ceruloplasmina*: que secuestra iones de Cu para impedir la formación de radicales libres a partir de peróxidos, siendo también capaz de oxidar el ion ferroso (Fe^{2+}) a férrico (Fe^{3+}). En el plasma, el cobre no unido a la ceruloplasmina está ligado principalmente a la *albúmina*, aunque parece ser que ésta no previene su interacción con H_2O_2 para formar el radical hidroxilo (68, 70).

C) AOX secuestradores de ERO, que inhiben la cadena de iniciación de reacciones de radicales libres o rompen la cadena de propagación de la misma.

Dentro de cada célula o compartimento biológico existen fases hidrofóbicas como membranas estructurales o lipoproteínas y fases acuosas como citosoles o la fase acuosa del plasma (68).

Los AOX intracelulares suelen ser compuestos liposolubles como los α -Tocoferoles, β -Carotenos y Ubiquinona o coenzima Q. Mientras que los AOX extracelulares son generalmente sistemas proteicos y compuestos hidrosolubles, como ácido ascórbico, ácido úrico y bilirrubina.

El ácido úrico, si bien es como un producto de desecho del metabolismo de las purinas, puede secuestrar directamente especies radicales como peroxilos y alcoxilos. Además, puede actuar en la fase de prevención de la oxidación, por un lado atrapando ERO y por otro uniéndose a iones de Cu y Fe (71, 72).

La bilirrubina, aunque inicialmente considerado como producto tóxico del metabolismo de los grupos hemo, puede inhibir la peroxidación lipídica *in vitro*, tanto en soluciones homogéneas como emulsiones (72, 73)

1.4.2. Antioxidantes nutricionales

En la protección de las células contra la oxidación, todos los niveles de defensa antioxidantes deben actuar en conjunto para formar un sistema integrado. La dieta es la mayor fuente de nutrientes que contienen propiedades antioxidantes o son elementos para la síntesis de enzimas antioxidantes.

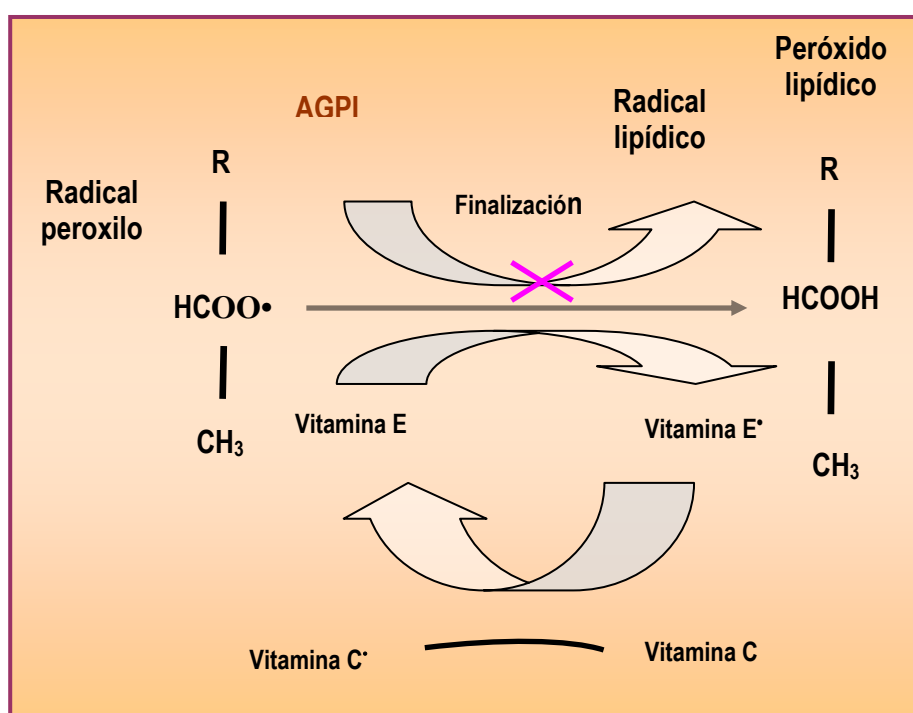
Diversos Metales (Cu, Zn, Se, Mn, Fe) participan como componentes o cofactores de numerosas enzimas AOX y ciertas vitaminas (ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno, ácido fólico) actúan como secuestradores de las ERO.

Vitamina E

Es la vitamina antioxidante liposoluble más ampliamente distribuida en la naturaleza. El término vitamina E comprende 8 compuestos diferentes estrechamente relacionados, básicamente tocoferoles y tocotrienoles, de los cuales el más abundante es el α - tocoferol. La vitamina E sintética es una mezcla equimolar de los 8 esteroisómeros del α - tocoferol, llamada all-rac- α - tocoferol.

Los tocoferoles se encuentran principalmente en las membranas de la mayoría de las células, protegiéndolas de la lipoperoxidación mediante la donación de un átomo de hidrógeno al radical peroxilo, formando un lípido hidroperóxido y convirtiéndose en α - tocoferil, escasamente reactivo, que puede ser reducido de nuevo a tocoferol por acción del ácido ascórbico o del glutatión, regenerándolo o que puede reaccionar de nuevo con un radical peroxilo (Figura 4) (74, 75).

Figura 4. Acción antioxidante de la vitamina E



Carotenoides

Casi todos los componentes de esta familia de polienos poseen actividad antioxidante. Su naturaleza lipofílica y su localización en el compartimiento hidrofóbico de las membranas biológicas y lipoproteínas hacen que sea un compuesto efectivo en la reducción de la peroxidación lipídica, actuando como inhibidor de las reacciones de oxidación en cadena. Dicha reacción se produce más fácilmente a bajas concentraciones de oxígeno y complementa la acción de la vitamina E, que funciona más eficazmente con concentraciones altas de oxígeno. El efecto antioxidante de la vitamina A se potencia en presencia de vitamina E, siendo máximo en una proporción 1:10 (retinol: tocoferol), que es precisamente la relación aproximada que guardan ambos compuestos en la mayoría de las membranas biológicas. (76, 77, 78).

Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico es una molécula hidrosoluble que se encuentra intra y extracelularmente en la mayor parte de los sistemas biológicos. El organismo humano no puede sintetizarla, por lo que la dieta debe contener una cantidad adecuada para mantener los niveles corporales. Su función AOX deriva de su capacidad de donar electrones (79). Actúa eficientemente atrapando los radicales libres en la fase acuosa, disminuye los niveles de H_2O_2 , de O_2^{\cdot} y del ion hipoclorito y protege frente a la peroxidación aumentando la actividad del α -tocoferol (80, 81). Otra función importante del ácido ascórbico es mantener estables los niveles de GPx (82).

Ácido fólico

La molécula de ácido fólico está compuesta por tres unidades características: una pteridina con una sustitución en su estructura, una molécula de ácido p-aminobenzoico y uno o más residuos de ácido L-glutámico unidos por enlaces peptídicos. Los humanos no somos capaces de sintetizar esta molécula *de novo*, siendo por tanto su única fuente la ingesta a través de la dieta. Se encuentra en forma reducida como tetrahidrofolato (THF) en el organismo humano y en los alimentos (83).

Actúa como cofactor en diversos procesos fisiológicos gracias a su capacidad de transferir restos monocarbonados, por lo que puede intervenir en dos grupos de reacciones: las de biosíntesis de nucleótidos y las de metilación, que emplean S-adenosilmetionina y que requieren, por tanto, un suministro constante de metionina. El ácido fólico es esencial para este aporte, ya que interviene junto al piridoxal fosfato (vitamina B₆) en la transformación de homocisteína a metionina (84).

Además la capacidad antioxidante *per se* del ácido fólico, ampliamente descrita en multitud de trabajos, es debida a su capacidad para oxidarse cediendo protones, actuando por tanto como agente reductor (85).

Selenio (Se)

Es un nutriente esencial para los humanos. Se presenta en dos formas diferentes: selenometionina y selenocisteína.

La función del Se como antioxidante no sólo se debe a su papel como cofactor de la GPx y otras selenoproteínas, sino también a su interacción con determinados nutrientes, como la vitamina E.

El selenio tiene un papel directo en el reciclaje del tocoferol por el glutatión, en una reacción catalizada por una selenoenzima (66).

Cinc (Zn)

El Zn participa en varias funciones del sistema de defensa antioxidante. Su intervención en la prevención de la peroxidación lipídica podría ser a través de la enzima Cu-Zn-SOD, donde el metal tiene un papel estructural. Además el Zn estabiliza las membranas, por lo que su deficiencia puede ocasionarle daños oxidativos. Los iones de Zn pueden unirse a los grupos sulfhidrilo de las proteínas, protegiéndose contra la oxidación (86).

Cobre (Cu)

El Cu participa en la defensa antioxidante a través de su intervención en la actividad de cuatro enzimas: la Cu-Zn-SOD intracelular, en la que el Cu tiene un papel catalítico; la SOD extracelular; la metalotionina que une Cu y puede tener actividad como secuestrante de ERO; y la ceruloplasmina, que puede eliminar diferentes ERO protegiendo a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas del daño oxidativo.

La deficiencia de Cu se ha asociado con una reducción de la actividad de la Cu-Zn-SOD y de la ceruloplasmina, y también a un incremento del daño oxidativo en los lípidos y en los niveles de LDL, por lo que podría incrementar el riesgo de aterosclerosis y cáncer. Sin embargo, un exceso de cobre también puede ser perjudicial, por el aumento en la producción de radicales de oxígeno a través de la reacción de Fenton (87).

Otros nutrientes con posible actividad antioxidante

El manganeso (Mn) forma parte de la SOD mitocondrial, por lo que también es un nutriente fundamental para la eliminación de ERO que se producen en la mitocondria (87).

Los aminoácidos azufrados metionina y cisteína también pueden participar, secundariamente, en la defensa antioxidante, ya que permiten la síntesis *de novo* del glutathion, por lo que reducen la necesidad de reciclaje y la reducción del glutathion oxidado. La actividad de la glutathion peroxidasa puede estar disminuida por una limitación tisular de cisteína (87).

Asimismo, la glutamina tiene propiedades antioxidantes ya que es un precursor del glutathion y de la taurina (88). Es el aminoácido más abundante en el organismo, representando el 50% del total. A pesar de ello, en situaciones de estrés metabólico se convierte en aminoácido esencial debido a que el aumento de sus requerimientos supera la capacidad de su producción endógena en el organismo. Esta situación de deficiencia de glutamina puede manifestarse como una alteración en la estructura y función de los tejidos y células donde su empleo es elevado (89).

1.4.3. Necesidades nutricionales

Es evidente que si la membrana mitocondrial se daña, las células pueden perder su capacidad de supervivencia como ocurre durante el EO. Para evitarlo se necesita una ingesta suficiente de elementos AOX, sin embargo, “más” no es necesariamente “mejor”, ya que las vitaminas y elementos traza tienen curvas dosis- respuesta con alto riesgo de toxicidad a niveles excesivos de ingesta (90, 91).

El balance entre fuerzas oxidantes y reductoras es muy sutil (92). La capacidad de secuestrar radicales libres está asociada con una transformación del propio antioxidante en un radical libre. Algunos elementos traza como Cu, Se y Fe pueden ser potentes prooxidantes, tanto *in vivo* como *in vitro*, como consecuencia de sus propiedades fisiológicas.

También es el caso de algunas vitaminas como ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno, las cuales pueden ser prooxidantes bajo determinadas condiciones (93).

Ingestas recomendadas

Los requerimientos nutricionales son un conjunto de valores de referencia de ingesta de energía y de los diferentes nutrientes, considerados como óptimos para mantener un buen estado de salud y prevenir la aparición de enfermedades tanto por exceso como por defecto (94).

Las entidades oficiales proponen las denominadas “Ingestas recomendadas”, cuyos valores se apoyan en datos experimentales (y ocasionalmente en datos epidemiológicos) que analizan los efectos de las deficiencias y excesos de cada nutriente en la salud de los individuos y se tienen en cuenta numerosos aspectos como la variabilidad interindividual de los requerimientos (en función de la edad, sexo y situación fisiológica), la biodisponibilidad del nutriente, su grado de utilización en el organismo, la existencia o no de precursores del mismo, las interacciones entre los diferentes nutrientes y con otras sustancias y su transporte y almacenamiento en el organismo (94).

Las ingestas recomendadas difieren según los criterios utilizados para su establecimiento. Destacan, por su

importancia y amplio uso a nivel internacional, las recomendaciones de la *Food and Nutrition Board (National Academy of Sciences, Institut of Medicine. United State of America)* denominadas *Dietary Reference Intakes (DRIs)* (90, 91) (Tabla 1).

El empleo de ingestas recomendadas es una aproximación que aporta estimaciones cuantitativas de la ingesta de nutrientes necesarias para prevenir deficiencias en individuos sanos (90, 91).

En España disponemos de las Ingestas Recomendadas de energía y nutrientes para la población española de 1994 (IR) (95), basadas en las establecidas por el *Food and Nutrition Board (National Academy of Sciences, Institut of Medicine. United State of America)* de 1980.

No obstante, las cantidades requeridas de AOX en condiciones patológicas especiales no se conocen ya que varía considerablemente por la situación clínica y tanto el uso habitual de fármacos como el estado nutricional pueden modificar los requerimientos.

Tabla 1. Ingestas Diarias Recomendadas (DRIs) de Vitaminas y Minerales antioxidantes

	Edad (años)	Vit A (μ /d) ^a	Vit E (μ /d) ^{b,c}	Vit C (mg/d)	Folato (μ /d) ^f	Vit B ₁₂ (μ /d) ^a	Cu (μ /d) ^a	Mn (mg/d)	Se (μ /d) ^a	Zn (μ /d) ^a
HOMBRES	19-30	900	15	90	400	2,4	900	420	700	11
	31-50	900	15	90	400	2,4	900	420	700	11
	51-70	900	15	90	400	2,4	900	420	700	11
	>70	900	15	90	400	2,4	900	420	700	11
MUJERES	19-30	700	15	75	400	2,4	900	320	700	8
	31-50	700	15	75	400	2,4	900	320	700	8
	51-70	700	15	75	400	2,4	900	320	700	8
	>70	700	15	75	400	2,4	900	320	700	8

Fuente: RDI para tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, folato, vitamina B12, ácido pantoténico, biotina y colina (1998); RDI para vitamina C, vitamina E, selenio y carotenos (2000); y RDI para vitamina A, vitamina K, arsénico, boro, cromo, cobre, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, níquel, silicio, vanadio y zinc (2001).

www.nap.edu

2. IMPLICACIONES DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN SITUACIONES PATOLÓGICAS

El EO se presenta en dos tipos de situaciones (96):

- ❖ Agudas (inflamación aguda, sepsis, shock séptico), caracterizadas por una activación intensa de células sanguíneas, especialmente fagocitos. En éste caso el EO es sistémico y frecuentemente su duración es limitada.
- ❖ Crónicas, asociadas a una continua activación celular donde el EO es habitualmente local pero de larga duración.

El EO, tanto agudo como crónico, afecta a una amplia variedad de funciones fisiológicas, por lo que está implicado en un gran número de enfermedades humanas degenerativas como la aterosclerosis, diabetes, enfermedades inflamatorias (artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal y pancreatitis), enfermedades neurológicas, hipertensión arterial, enfermedades oculares, enfermedad pulmonar y hematológica. También es un importante factor fisiológico durante la inflamación sistémica aguda que ocurre después de una lesión (97-100).

Esta implicación no significa que las ERO desempeñen siempre un papel directo en el desarrollo de la enfermedad. De hecho, las especies reactivas predisponen al organismo a enfermedades causadas por otros agentes. En muchos casos, el daño oxidativo es más una consecuencia del daño tisular que produce la enfermedad que una causa del mismo y puede entonces contribuir a empeorar el daño tisular generado (101).

2.1. El paciente crítico y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)

Cuando el organismo entra en contacto con cualquier agente agresor, independientemente de su naturaleza, experimenta una reacción en la que participan componentes neuroendocrinos y humorales y cuya finalidad inmediata es la de establecer la homeostasis (102).

2.1.1. Fases de la respuesta sistémica a la agresión

La respuesta a la agresión fue dividida por Cuthbertson en 1942 en una fase inicial llamada “*ebb*” o hipodinámica, otra llamada “*flow*” o hiperdinámica y otra anabólica o de reparación. Actualmente se admite una división más adecuada a la realidad (Figura 5):

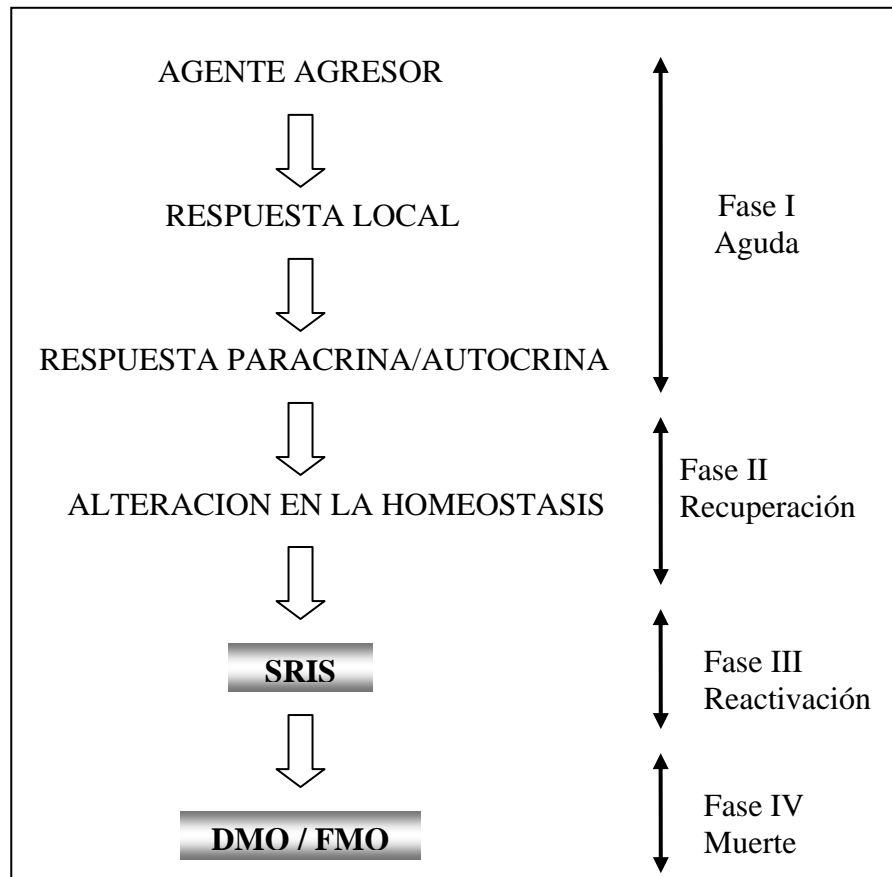
El proceso de agresión es dinámico y no obligatoriamente consecutivo. La fase aguda (fase I) comienza en el instante de contacto del organismo con el agente agresor y tiene una duración de 2 ó 3 días. Si la evolución es favorable concluye con la fase de reparación (fase II) (103).

En algunos casos, ya sea por la intensidad o la duración de la noxa o por una respuesta inadecuada del huésped, se produce un estado de reactivación (fase III) de las células inflamatorias, con liberación de células inmaduras y activación de monocitos y macrófagos, que liberan poderosos mediadores proinflamatorios e inducen un estado de inflamación sistémica generalizada (103).

Este proceso se define clínicamente como Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS). Si el curso de la

enfermedad sigue siendo adverso, se entrará en la fase de disfunción/fallo multiorgánico o fase IV, que frecuentemente conduce a la muerte.

Figura 5. Fases de la respuesta sistémica a la agresión



Las condiciones que llevan al SRIS incluyen infección, traumatismos, quemaduras y cirugía, entre otras.

La sepsis es el cuadro clínico de respuesta inflamatoria del huésped a la infección. No obstante, su definición y las manifestaciones clínicas son aún fuente de controversia. Se reconocen diferentes grados clínicos (sepsis, sepsis grave y shock séptico) que constituyen un *continuum* del proceso infeccioso (104).

Hasta 1992 no se disponía de una terminología unificada para designar los procesos relacionados con la sepsis y establecer criterios diagnósticos, por lo que el *American College of Chest Physicians/Society of Critical Medicine (ACCP/SCCM)* en una Conferencia de Consenso estableció que la sepsis grave exige el fallo de un órgano; el shock séptico es una sepsis grave en la que el órgano que falla es el cardiovascular y si hay dos o más fallos de órganos se trataría de un fallo multiorgánico (FMO) (105).

El fallo multiorgánico es común en una Unidad de Cuidados Intensivos. Un estudio multicéntrico observacional, *“Sepsis Occurrence in Acutely ill Patients” (SOAP)* (106), reveló que más del 71% de los pacientes críticos tienen un grado considerable de disfunción orgánica.

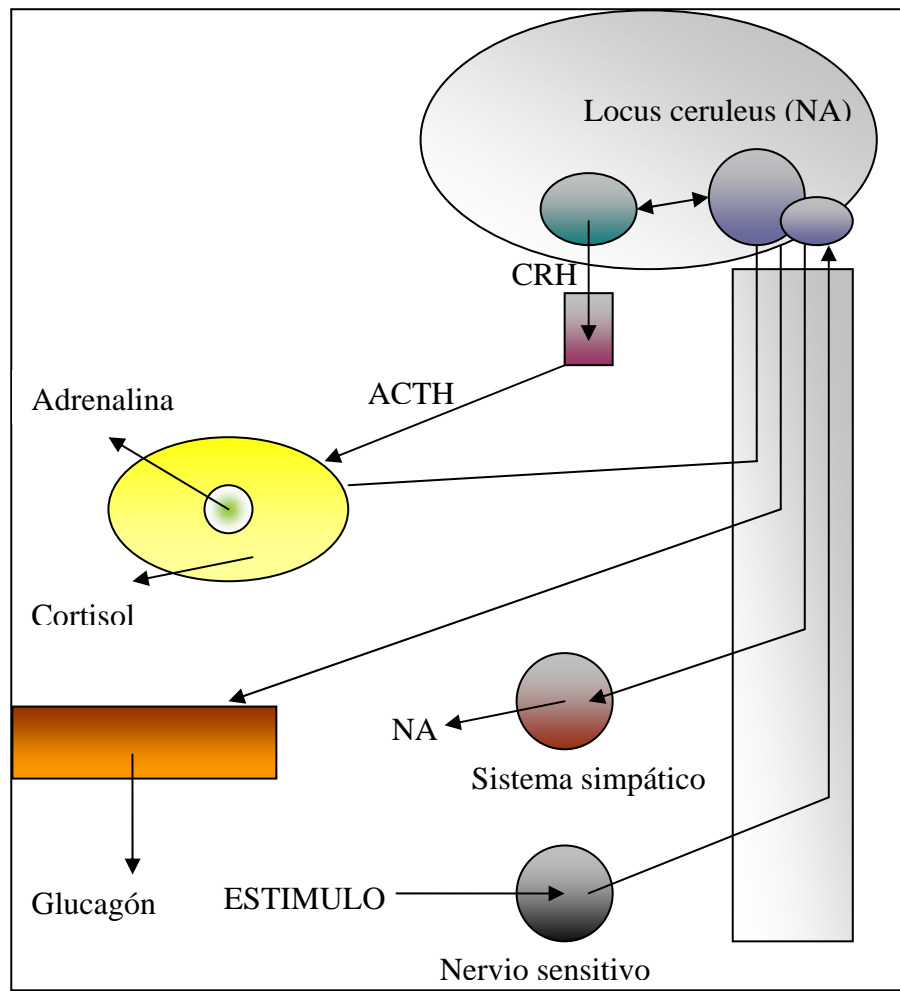
Se han utilizado numerosos parámetros fisiológicos e intervenciones terapéuticas para definir el fallo multiorgánico. La escala más empleada es el SOFA (*Secuency Organ Failure Assessment*), que describe y cuantifica el grado de disfunción orgánica en el tiempo. Los órganos más comúnmente considerados para describir el fallo/disfunción de órganos son el pulmonar, cardiovascular, renal, hepático, hematológico y el sistema nervioso central (107). Pero otros órganos considerados en este contexto son el gastrointestinal, metabólico, endocrino y la función inmunológica.

El alcance de la afectación de cada órgano en particular en pacientes con FMO es variable.

2.1.2. Componentes de la respuesta sistémica a la agresión

El SRIS tiene un componente neuroendocrino y otro inflamatorio mediado por la inmunidad, ambos interconectados (108) (Figura 6).

Figura 6. Respuesta sistémica a la agresión



Mecanismo neuroendocrino

Determinados estímulos secundarios a la repercusión sistémica de la inflamación, como pueden ser el dolor, la acidosis o la hipovolemia, conducen a través de nervios sensitivos, la señal al sistema noradrenérgico central del

núcleo ceruleus y al hipotálamo, segregándose corticotropina (CRH) y noradrenalina (NA). La CRH estimula la secreción de adenocorticotropina (ACTH) por la adenohipófisis y ésta a su vez estimula la secreción de cortisol por las glándulas suprarrenales (109).

El cortisol y las catecolaminas mantienen la homeostasis cardiovascular, metabólica e inmune durante el estrés. Por otro lado, la activación simpática a través de receptores β -adrenérgicos, estimula la secreción de glucagón por el páncreas, así como la secreción de adrenalina por la médula suprarrenal (110).

Mecanismo inflamatorio

Simultáneamente, la agresión sobre un órgano desencadena la activación del sistema inmune (coagulación, complemento, prostaglandinas, leucotrienos y fibrinólisis) modulado por las citocinas, mediadores inmunes que son sintetizados por los leucocitos (111).

Inicialmente se produce una liberación de mediadores de carácter proinflamatorio, regulados fundamentalmente por la acción de las citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6. Inmediatamente se desencadena una respuesta antiinflamatoria, mediada por las citocinas antiinflamatorias, fundamentalmente IL-4, IL-10, IL-13 y TNF- β , que intentan contrarrestar el efecto de las inflamatorias (111).

También se liberan mediadores secundarios como especies reactivas de oxígeno (ERO), proteínas y eicosaenoides, dirigidos fundamentalmente a destruir la noxa (102).

2.1.3. Alteraciones metabólicas de la respuesta sistémica a la agresión

Las citocinas proinflamatorias combinadas con la elevación de catecolaminas, cortisol y glucagón estimulan alteraciones metabólicas que promueven el catabolismo, con el resultado de glucólisis hepática, neoglucogénesis sistémica y lipólisis. Todo esto determina hiperglucemia con mala utilización periférica, hipertrigliceridemia e hipocolesterolemia (112).

Alteración del metabolismo de los hidratos de carbono

La glicolisis, estimulada por las citocinas, está aumentada provocando un flujo de captación de glucosa fundamentalmente en células fagocíticas acompañada de una resistencia a la captación en el músculo esquelético donde, por el contrario se crea una corriente de sustratos hacia la neoglucogénesis hepática (112).

La neoglucogénesis está aumentada por la acción sinérgica de citocinas, cortisol, catecolaminas y glucagón a partir de lactato, aminoácidos glucogénicos (alanina, glutamina y glicina) y glicerol (112).

La resistencia a la insulina es directamente proporcional a la gravedad de la respuesta sistémica. El sentido de la hiperglucemia persistente es el de asegurar el suministro energético a los tejidos lesionados y a los órganos que dependen de la glucosa como único sustrato (112).

Alteración en el metabolismo de las proteínas

El metabolismo proteico está marcado por un acelerado catabolismo. El cortisol y las catecolaminas activan la proteólisis muscular. Los aminoácidos de cadena ramificada procedentes de la proteólisis muscular son oxidados en el miocito. Alanina y glutamina son enviadas a la circulación, para ser captados por el hígado como sustrato para la neoglucogénesis y, junto con otros aminoácidos, para la síntesis proteica (113).

Por tanto, en el hígado hay una síntesis incrementada de proteínas de la fase aguda, pero una disminución en la síntesis de albúmina y de oxidación de aminoácidos. En los tejidos viscerales, hay una tasa incrementada en la síntesis de proteínas, lo que solo se compensa parcialmente por la degradación elevada en el músculo (113).

Alteración en el metabolismo de los lípidos

El cortisol y las catecolaminas provocan una intensa lipólisis activando la lipasa a nivel de los adipocitos, sin embargo, la estimulación β -adrenérgica es probablemente, el mayor mecanismo de lipólisis (114).

Los ácidos grasos resultantes de la lipólisis son oxidados fundamentalmente a nivel del músculo esquelético, corazón e hígado. En éste último se produce cierto grado de reesterificación de ácidos grasos formandose nuevos triglicéridos (114).

Un aumento en la producción hepática de triglicéridos y un empeoramiento del aclaramiento puede resultar en esteatosis (114).

Una respuesta inflamatoria persistente constituye un factor de riesgo en el desarrollo de la disfunción y fracaso multiorgánico en los pacientes críticos. Esta característica puede deberse al aumento continuo de desencadenantes proinflamatorios como el óxido nítrico (ON'), peroxinitrito ($ONOO'$) y ERO (115).

2.1.1. Mecanismos y vías de producción de ERO en el paciente crítico

Las ERO pueden producirse básicamente por cuatro caminos diferentes (116):

- **La cadena respiratoria mitocondrial**, que ocurre en las disfunciones mitocondriales severas, como la observada en el shock séptico.
- **Actividad del sistema NADPH oxidasa**, vía predominante en la sobreproducción de ERO durante la sepsis severa.
- **Incremento de la enzima Xantina Oxidasa**, activada durante la cirugía vascular y cardíaca y durante el trasplante de órganos.
- **Iones metálicos como Fe y Cu**, que son liberados en lisis celulares y pueden ampliar el EO.

Independientemente de la vía que inicie la producción de ERO, se crea un ciclo de inflamación, activación celular y generación de ERO (117). (Figura 7).

produce una acumulación de metabolitos de purina (adenosina, inosina e hipoxantina) (117).

Al mismo tiempo, la xantina deshidrogenasa es activada a xantina oxidasa, por una oxidación o una degradación proteolítica irreversibles.

Durante la reperfusión, el oxígeno es reintroducido pudiendo desarrollarse una rápida oxidación de purinas generando uratos y radicales superóxidos ($O_2^{\cdot-}$); éstos últimos pueden generar, secundariamente, radicales hidroxilos (HO^{\cdot}) altamente tóxicos, facilitando nuevamente una reacción catalizada por el hierro.

Por otro lado, la activación de la respuesta de los neutrófilos, macrófagos y otros componentes del sistema inmune pueden activar el sistema NADPH oxidasa asociado a la membrana, capaces de oxidar el NADPH a NAD^+ , generando radicales superóxidos ($O_2^{\cdot-}$).

La dismutación espontánea del radical superóxido lo convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular a pH fisiológico.

Las ERO y las ERN no solo producen un daño directo de los componentes celulares, sino que también desencadenan la liberación de citocinas, que activan la cadena inflamatoria e incrementan la expresión de moléculas de adhesión (117).

Los mediadores proinflamatorios activan el flujo de células inflamatorias en tejidos y órganos y pueden directamente causar disfunción mitocondrial, llevando a más isquemia y lesión tisular (117).

2.3. Efecto de la hiperhomocisteinemia en el endotelio vascular

Otro mecanismo que recientemente se ha implicado en la generación de ERO, es el efecto de niveles elevados de homocisteína plasmática.

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido tiol sintetizado durante la conversión metabólica de metionina a cisteína. Para mantener concentraciones intracelulares fisiológicas, aproximadamente el 50% de la Hcy intracelular producida es transformada por remetilación a metionina, y la Hcy restante es transulfurada a cisteína. Este proceso requiere varias etapas en las que participa el ácido fólico activado (5,10 metiltetrahidrofolato) y enzimas que requieren vitamina B₆ y B₁₂ como cofactores (118, 119).

Tanto los defectos enzimáticos, como las deficiencias o alteraciones en la distribución de las vitaminas involucradas en el metabolismo de la Hcy, la interacción con los estilos de vida, enfermedades y fármacos o la combinación de todos ellos, pueden alterar las vías metabólicas y por tanto producir hiperhomocisteinemia (HH) (119).

Un incremento de la concentración de Hcy plasmática total mayor a 14 $\mu\text{mol/L}$ representa un factor importante de riesgo independiente de la morbilidad en la enfermedad cardiovascular y la mortalidad en la población en general (120). Aunque no está definitivamente confirmado, esto se atribuye a múltiples efectos nocivos de la Hcy sobre el endotelio y células del músculo liso, plaquetas, interferencia con la oxidación de las LDL, y con la cascada de coagulación como así también la vasodilatación dependiente del óxido nítrico (ON) (120-122).

Numerosos estudios sugieren que la homocisteína plasmática total tiene un efecto prooxidante *per se* y un papel en la liberación de especies reactivas de oxígeno que resulta en el daño a células endoteliales arteriales (123).

Los mecanismos patogénicos propuestos mediante los cuales la HH puede causar tanto daño vascular, como alteración cognitiva y complicaciones neurológicas, entre otras, son principalmente los procesos oxidativos. La interacción con el ON y otros cambios adaptativos en la actividad de diferentes sistemas antioxidantes apoyan fuertemente el hecho de que la hiperhomocisteinemia está implicada en el estrés oxidativo (EO) (124-125).

Por otra parte se ha comprobado que promueve la modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). También se ha descrito que afecta a los sistemas antioxidantes enzimáticos y que promueve la peroxidación lipídica, caracterizado por una elevación plasmática de dienos conjugados, hidroperóxidos lipídicos y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (126).

Por ello, en condiciones normales, es rápidamente metabolizada enzimáticamente de forma que se encuentra a muy baja concentración en el torrente circulatorio (5-15 $\mu\text{mol/l}$). Los daños oxidativos derivados de bajos niveles de folatos y altos niveles de Hcy puede que jueguen un importante papel en la etiopatogénesis de distintas enfermedades (118).

Durante la enfermedad crítica, además de los mecanismo antes descritos, muchos factores pueden combinarse para incrementar drásticamente la producción de radicales libres y su consecuente daño a los tejidos: la elevación de la concentración de oxígeno por compromiso respiratorio, el

tratamiento con óxido nítrico, el empeoramiento de la función renal que lleva a la disminución de depuración de sustancias que pueden ser pro-oxidantes, el desequilibrio de fluidos y electrolitos y la pérdida masiva de antioxidantes (126)

2.4. Déficit de micronutrientes en pacientes críticos

El SRIS está asociado con una redistribución desde la circulación a los órganos y tejidos de vitaminas y elementos traza, los cuales están involucrados en la síntesis proteica y la producción de células inmunes. La concentración plasmática de la mayoría de los elementos traza (Fe, Se, Zn) y sus proteínas transportadoras así como de las vitaminas hidrosolubles disminuye, mientras que las concentraciones de Cu y Mn se incrementan (128, 129, 130).

Los niveles circulantes de antioxidantes también se ven afectados por las pérdidas agudas a través de fluidos biológicos (exudados, drenajes, pérdidas de quilo y digestivas, etc.) y por la dilución, como resultado de los fluidos empleados para la resucitación. A esto se suma el aporte deficiente de elementos con capacidad AOX a través de la nutrición (131-134).

Los consensos de expertos de distintas entidades han realizado grandes esfuerzos para definir las cantidades totales de energía y proteínas y el consumo diario de los micronutrientes necesarios para prevenir la aparición de deficiencias específicas a través de las diferentes recomendaciones. Sin embargo, éstas están diseñadas para garantizar los requerimientos de una población sana, por lo que no pueden aplicarse en sentido estricto a los sujetos que reciben nutrición artificial, enteral (NE) o parenteral (NP), ya que se considera que sus necesidades están incrementadas por la situación clínica.

No obstante, en el caso de la NE los requerimientos de los pacientes pueden basarse razonablemente en las recomendaciones ya que en la Unión Europea existe una normativa especial que regula la cantidad de micronutrientes que deben contener los alimentos dietéticos para usos médicos especiales por 2000 Kcal. De esta forma se relaciona el aporte energético con la ingesta de micronutrientes. Sin embargo, en el caso de la NP las recomendaciones de vitaminas y otros micronutrientes no serían válidas, ya que se obvia la absorción de los nutrientes. La Sociedad Americana de Nutrición Enteral y Parenteral (ASPEN) (135) establece rangos generales para la administración segura de micronutrientes, adaptando las DRIs para nutrición enteral y parenteral, pero advierte que la prescripción de estos nutrientes debe individualizarse para cada paciente y su situación clínica.

Es decir, en los pacientes críticos las recomendaciones son sólo orientativas ya que la mayor tasa de oxidación biológica que suele existir en las enfermedades graves probablemente incrementa los requerimientos diarios de vitaminas y elementos traza, muy por encima de los valores señalados.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que en el pasado, las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno fueron consideradas principalmente sustancias tóxicas, responsables del daño de toda clase de macromoléculas como lípidos (principalmente membranas lipídicas), proteínas y también ADN. Sin embargo, en la enfermedad crítica, dependiendo del estado de ésta, la situación redox óptima puede variar considerablemente.

Para los linfocitos, un bajo potencial redox resulta beneficioso para su proliferación. Por otro lado, los monocitos y

neutrófilos necesitan un alto potencial redox para la destrucción de los microorganismos invasores (136).

Por esta razón, es importante adaptar las intervenciones terapéuticas para lograr una situación redox óptima, que puede variar en cada caso, ya que después de una lesión, trauma o cirugía, la concentración de AOX circulantes disminuye rápidamente y quedan por debajo de niveles normales durante varios días o semanas (137).

Las bajas concentraciones endógenas de AOX están asociadas a un incremento en la generación de radicales, a un aumento del SRIS y la subsiguiente lesión celular, con aumento de la morbilidad y mortalidad en pacientes críticos.

3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ENFERMEDAD GRAVE. REVISIÓN DE LA EVIDENCIA

3.1. Estudios de biomarcadores de estrés oxidativo

Diversas condiciones críticas están claramente provocadas, mantenidas o empeoradas por un incremento en la producción de ERO. Numerosos trabajos han descrito estrés oxidativo en diferentes situaciones clínicas, evidenciado por incremento de biomarcadores del daño a estructuras celulares y/o por la disminución de antioxidantes circulantes (Tabla 2) (138).

Tabla 2. Estrés oxidativo en diferentes situaciones críticas

Autores	Situación crítica	Biomarcadores	Resultados
<p><i>Tsai et al. 2000.</i> (139) <i>Motoyama et al. 2003.</i> (140) <i>Alonso de Vega y cols. 2002.</i>(141)</p>	SRIS	<p>↑ TBARS ↑ MDA, 4-hidroxinonal ↓ TRAP y componentes</p>	Desarrollo de fallo multiorgánico
<p><i>Ogilvie et al. 1991.</i> (142) <i>Galley et al. 1996.</i> (143) <i>Goode et al. 1995.</i> (144) <i>Borrelli et al. (1996.</i> (145) <i>Cowley et al. 1996.</i> (146)</p>	Sepsis	<p>↑ Peróxidos lipídicos ↑ MDA, actividad xantina oxidasa ↑ TBARS ↓ Tocoferol ↓ Selenio ↓ Vitamina A, caroteno y licopeno ↓ Vitamina C</p>	Mayor incidencia de fallo multiorgánico y peor pronóstico
<p><i>Strand et al. 2000.</i> (147) <i>Ohya et al. 2002.</i> (148)</p>	Shock Séptico	<p>↑ Grupos carbonilos ↑ ON, OON</p>	Peor pronóstico
<p><i>Bowler et al. 2003.</i> (149) <i>Sznajder et al. 1989.</i> (150) <i>Baldwin et al. 1986.</i> (151) <i>Carpenter et al. 1998.</i> (152) <i>Richard et al. 1990.</i> (153) <i>Metnitz et al. 1999.</i> (154) <i>Quinlan et al. 1996.</i> (155) <i>Kumar et al. 2000.</i> (156)</p>	SDRA	<p>↑ Isoprostanos ↑ Peróxidos lipídicos ↓ Tocoferol, caroteno y selenio ↓ AOX hidrosolubles</p>	
<p><i>Alonso de Vega et al. 2000.</i> (157) <i>Winterbourn et al. 2000.</i> (158) <i>Curran et al. 2000.</i> (159) <i>Ritter et al. 2003.</i> (160) <i>Polidori et al. 2001.</i> (161)</p>	Población de UCI mixta	<p>↑ TBARS ↑ Grupos carbonilos ↑ Actividad xantina oxidasa ↓ Caroteno, vitamina E, A y C</p>	Asociación con resultados clínicos adversos

3.2. Estudios de suplementación antioxidante

La investigación del efecto de los nutrientes antioxidantes en el paciente crítico se han centrado principalmente en cinco micronutrientes: Cu, Se, Zn, vitaminas C y E y recientemente las del grupo B. Las dosis utilizadas en los diferentes estudios se muestran la tabla 3 a y 3 b.

Son varios los ensayos no controlados y estudios de casos y controles que muestran efectos beneficiosos de la suplementación AOX.

Recientemente, Heyland y cols. (162) publicaron un metaanálisis de ensayos prospectivos aleatorizados sobre el empleo de micronutrientes AOX, cuyos resultados revelaron que los elementos traza (particularmente selenio) y las vitaminas con función AOX, administrados solos o en combinación con otros AOX, son seguros y pueden estar asociados con una reducción de la mortalidad en pacientes críticos.

En todos estos estudios, el mecanismo por el que se obtienen los beneficios clínicos y biológicos se argumenta en el refuerzo de las defensas AOX (163-173).

Si bien los hallazgos mas significativos de éste metaanálisis fueron los relacionados con la suplementación de Se a altas dosis, se debe considerar que tanto el Se como el glutatión y las vitaminas A y C actúan sinérgicamente para regenerar antioxidantes lipo e hidrosolubles.

Tabla 3.a. Ensayos clínicos aleatorizados que evalúan la suplementación antioxidante en pacientes críticos.

Estudio	Población	Vía	Intervención	Resultados
Nathens et al. 2002. (163)	UCI Trauma quirúrgica general N=770	Intravenosa y enteral	α tocoferol 1000 UI c/8h vía oro o nasogástrica y ácido ascórbico 1000 mg c/8h vía IV vs cuidado estándar	Neumonía Fallo multiorgánico
Preiser et al. 2000. (164)	UCI mixta N=51	Enteral	Fórmula con antioxidantes vía NE (133 µg/100 ml vit A, 13 mg/100 ml vit C, y 4.9 mg/100 ml vit E) vs fórmula estándar isonitrogenada, isocalórica (67 µg/100 ml vit A, 5 mg/100 ml vit C y 0.81 mg/100 ml vit E) días 0-7	Tolerancia de la LDL al estrés oxidativo
Young et al. 1996. (165)	Pacientes con daño cerebral severo, ventilados N=68	Primero intravenosa y después oral	12 mg Zn elemental vía NP, progresando hacia zinc oral días 0-15 vs 2.5 mg Zn elemental, progresando hacia placebo oral	Resultado neurológico (Glasgow coma score a los 28 días)
Maderazo et al. 1991. (166)	Traumatismo cerrado o no penetrante	Intravenosa	200 mg vit C, después 500 mg + 50 mg α tocoferol vs 2 grupos (200 mg ácido ascórbico vs 50 mg α tocoferol) días 0-7; todos los grupos recibieron NE o dieta oral	

Heyland, 2002

Tabla 3.b. Ensayos clínicos aleatorizados que evalúan la suplementación antioxidante en pacientes críticos.

Estudio	Población	Vía	Intervención	Resultados
Berger y cols. 2001. (167)	Pacientes traumatológicos, UCI quirúrgica N=32	Intravenosa	Suplemento de Se (500 µg/día) vs placebo	Estado AOX Función tiroidea
Porter y cols. 1999. (168)	UCI quirúrgica Pacientes con trauma penetrante con ISS ≥ 25 N=18	Intravenosa y enteral	50 µg Se IV c/6h + 400 UI vit E, 100 mg vit C c/8h y 8 g de acetilcisteína (NAC) c/6h entre los días 0-7 vía nasogástrica u oral vs nada	Fallo orgánico Infecciones Estancia en UCI
Berger y cols. 2001 (169)	Quemados >30% TBSA N=20	Intravenosa	Cu IV (40.4 µmol), Se (159 µg), Zn (406 µmol) + elementos traza estándar vs elementos traza estándar (Cu 20 µmol, Se 32 µg, Zn 100 µmol) entre los días 0-8, todos recibidos precozmente por NE	Infecciones Estancia UCI
Kuklinski y cols. 1991 (170)	Pacientes con necrosis pancreática aguda N=17	Intravenosa	Suplemento de SE IV (500 µg/día) vs NP sin suplemento de selenio	Letalidad
Zimmerman y cols. 1997 (171)	Pacientes con SRIS, APACHE >15 y SOFA>6 N=40	Intravenosa	1000 µg Na-selenito en bolo IV y 1000 µg Na-selenito/24h en infusión continua durante 28 días vs estándar	Letalidad
Angstwurm y cols. 2001 (172)	Pacientes con SRIS N=42	Intravenosa	NP con alta dosis de Se (535 µg x 3 días, 285 µg x 3 días y 155 µg x 3 días y 35 µg después) vs baja dosis de Se, 35µg selenio/día durante el estudio	Fallo renal agudo Resultado UCI
Berger y cols. 2002 (173)	Quemados >20% TBSA N=17	Intravenosa	100 ml Cu (59 µmol) + Se (380 µg) + Zn (574 µmol) vs ClNa (0,9%) desde la admisión durante 14-21 días	Niveles titulares de selenio y zinc Infecciones

Heyland, 2002

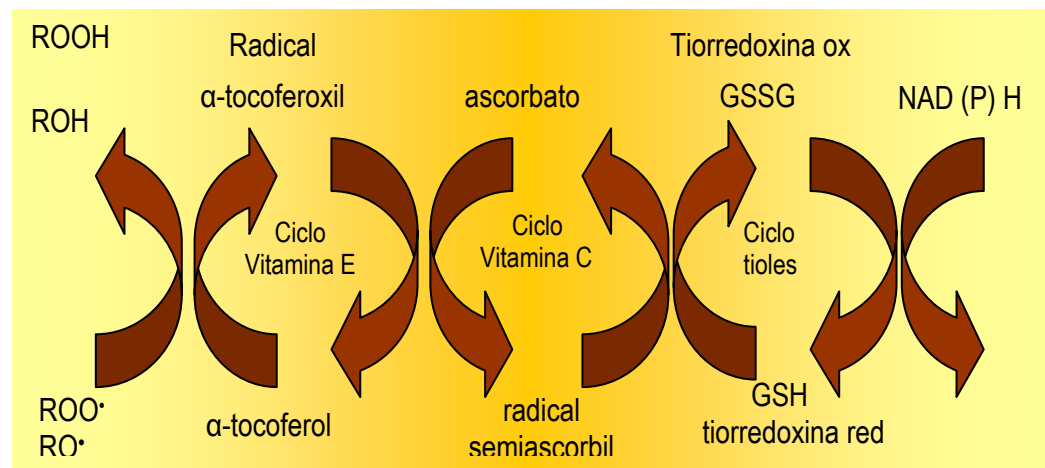
Además, la administración de una combinación de micronutrientes AOX en un estadio temprano en el curso de una

enfermedad aguda puede ser superior al aporte simple de un AOX, sobre todo porque ese nutriente AOX puede ocasionar disturbios en todo el sistema de defensa AOX ya que puede convertirse en prooxidante (134).

El hecho de que los AOX interactúen unos con otros en sus efectos protectores (Figura 8) lleva a pensar que el nivel conjunto de todos los AOX es el dato que debe optimizarse, más que el nivel de uno de ellos individualmente (174, 175). Se debería tener en cuenta la importancia de una suplementación basada en un grupo de AOX más que en el hecho de suplementar con un único AOX.

Aunque la evidencia no muestra perjuicio de nutrientes AOX, todavía no se ha confirmado su beneficio. Estos hallazgos constituyen más bien la generación de una hipótesis y no la confirmación de la misma.

Figura 8. Red Antioxidante



Adaptada de Morantes (2006)

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Los pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) sufren un empeoramiento de los biomarcadores de estrés oxidativo durante su estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos, lo que se asocia a la ingesta insuficiente de antioxidantes y a una mayor morbimortalidad.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar el estrés oxidativo de los pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y su modificación a la semana de estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos, valorando su asociación con los niveles de antioxidantes endógenos, exógenos y la gravedad.

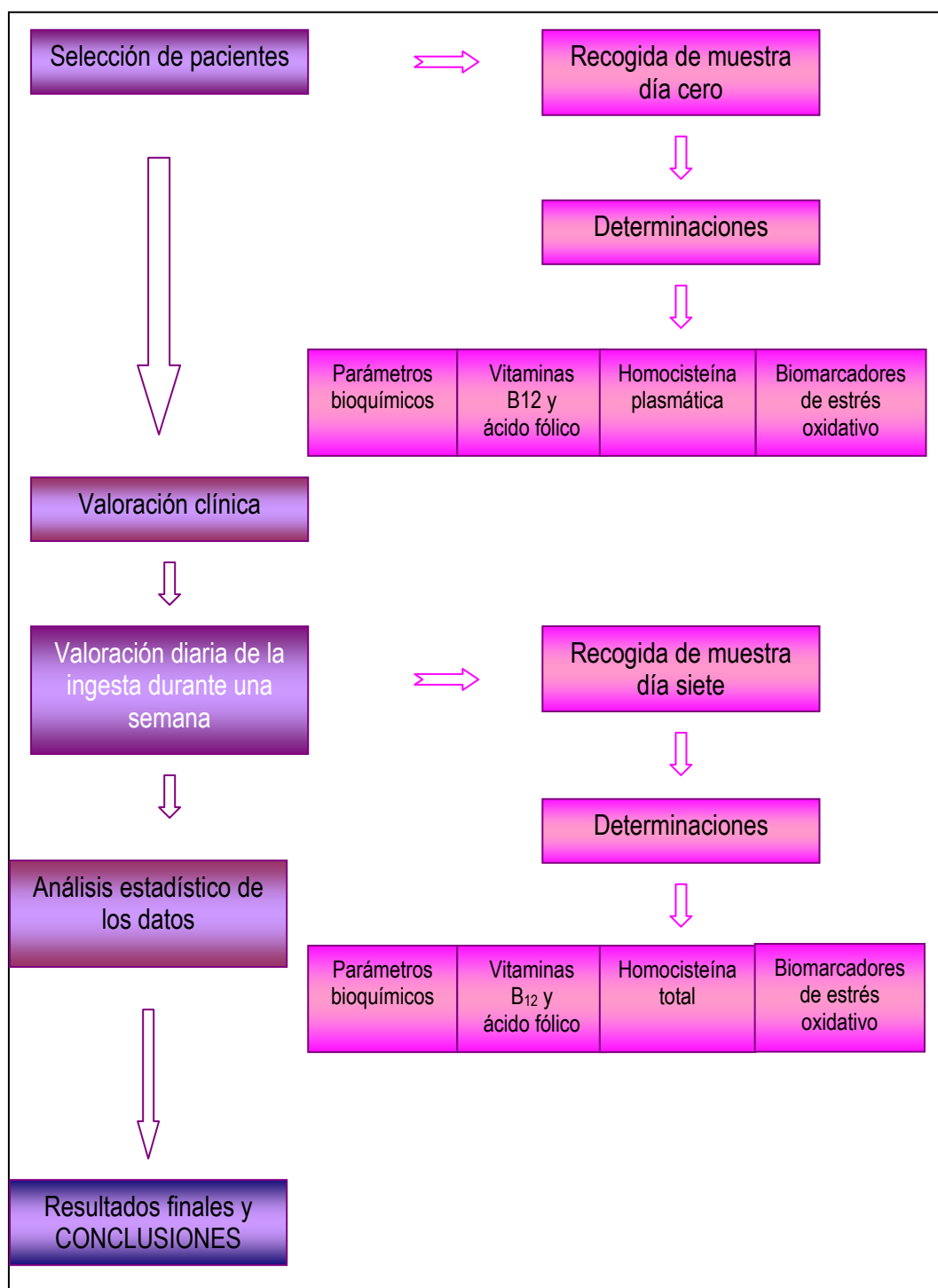
Objetivos específicos

- Estudiar las alteraciones del *status* de biomarcadores de oxidación de proteínas y lípidos y la capacidad antioxidante total al ingreso y a la semana de estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos.
- Cuantificar la ingesta media de antioxidantes nutricionales a la semana de estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos y evaluar su asociación con antioxidantes endógenos y con los cambios en el estrés oxidativo.
- Valorar la prevalencia de hiperhomocisteinemia en los pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y su asociación tanto con el estrés oxidativo como con la deficiencia de vitaminas específicas.
- Determinar la asociación del estrés oxidativo con la mayor gravedad y la mortalidad de los pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio observacional prospectivo y analítico en el que se siguieron a los pacientes incluidos desde su ingreso hasta el séptimo día de estancia en UCI. Las pruebas y análisis realizados se esquematizan en el siguiente diagrama:



2. Población objeto de estudio y selección de la muestra

2.1. Pacientes del estudio

La muestra estuvo constituida por pacientes críticos con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

2.2. Selección de pacientes y criterios de inclusión

Para seleccionar los pacientes de nuestro estudio, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

1. Presencia de SRIS.
2. Expectativa de permanencia en UCI de al menos una semana.
3. Situaciones clínicas que impidan que los pacientes, por si mismos, tomen alimentación oral.
4. Edad mayor o igual a 18 años.
5. Firma previa del consentimiento informado por parte del paciente o se representante.

2.3. Tipo de muestreo

Se utilizó un muestreo no probabilístico consecutivo, ya que se incluyeron todos los pacientes que, cumpliendo los criterios establecidos, ingresaron en la UCI durante un período de dos años, ambos incluidos.

2.3.1. Tamaño muestral y descripción de la muestra

Para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó el programa informático Epiinfo versión 6.04, en donde se emplearon los resultados obtenidos en una prueba piloto de 20 pacientes.

Las variables de estudio que se incluyeron en el programa fueron cuantitativas tomadas en dos períodos: al ingreso y séptimo día de peróxidos lipídicos, grupos carbonilos y capacidad antioxidante total.

Se calculó para cada variable la diferencia de medias asumiendo un error mínimo de 5% y un nivel de confianza del 95%.

Se tomó el mayor valor calculado, por lo que la muestra de estudio estuvo constituida por 60 pacientes.

3. Valoración clínica y nutricional

3.1. Historia clínica

De las historias clínicas de cada individuo se reunió información sobre diagnósticos y procedimientos principales y secundarios; que fue completada con los programas informáticos de “Informe de alta” y “Codificación” del hospital. Tanto los diagnósticos como los procedimientos se codificaron según el criterio de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-9ª Edición).

Con el fin de facilitar el análisis de los datos, se realizó una agrupación de los diagnósticos principales y en su defecto, de los secundarios atendiendo a los mismos criterios de clasificación que los empleados por la CIE-9.

3.2. Valoración de la presencia del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

Se evaluaron las constantes vitales, tomadas de las gráficas de la historia clínica y el recuento de leucocitos/mmc. Se tomó el valor más desfavorable en las primeras 24 horas para cada una de ellas y se determinó la presencia de SRIS según si el paciente presentaba 2 ó más de los siguientes parámetros (105):

- Temperatura $> 38^{\circ} \text{C}$ ó $< 36^{\circ} \text{C}$.
- Frecuencia cardíaca > 90 latidos/minuto.
- Frecuencia respiratoria > 20 respiraciones/minuto.
- Leucocitos $> 12.000/\text{mmc}$ ó $< 4.000/\text{mc}$ ó $> 10\%$ de formas inmaduras.

3.3. Valoración de la gravedad

Para valorar la gravedad de la enfermedad y la disfunción orgánica se utilizaron dos sistemas de puntuación:

a) **APACHE II** (*ACUTE PHYSIOLOGY AND CHRONIC HEALTH EVALUATION II*) (177): se divide en dos componentes. El primero consta de doce variables fisiológicas. A 11 de éstas se le asignan valores de 0 a 4 puntos según el grado de desviación respecto al estándar de normalidad, que se puntúa como cero. La variable restante es la escala de coma de Glasgow (GCS), la cual consiste en tres componentes esenciales del examen neurológico que totalizan 15 puntos: apertura de ojos (4 puntos), mejor respuesta verbal (5 puntos) y mejor respuesta motora (6 puntos); la puntuación correspondiente se calcula restando de 15 el valor GCS para el paciente en estudio. La determinación tiene lugar en las primeras 24 horas del ingreso, escogiendo el valor más desfavorable de cada variable durante ese período. Con la

suma de las puntuaciones de estas variables se obtiene el primer componente.

El segundo componente recoge la edad y el estado de salud previo (presencia de enfermedad crónica definida de los sistemas cardiovascular, respiratorio, hepático, renal e inmunológico) como variables a puntuar en una segunda escala denominada *Chronic Health Evaluation*.

La suma de los valores de ambos componentes constituye la puntuación APACHE II. La puntuación máxima posible de este sistema es 71, pero muy pocos pacientes sobreviven pasando los 55 puntos (178).

b) **SOFA SCORE** (“Sequential Organ Failure Assesment”): sistema de puntuación diseñado para describir una secuencia de complicaciones en el enfermo crítico, que valora la disfunción orgánica y tiene una buena correlación con la mortalidad (177).

Se determina evaluando la función de 6 órganos o sistemas (respiratorio, coagulación, circulatorio, hepático, cerebro y renal). Cada uno de ellos se puntúa de 0 a 4. El fallo individual se corresponde con un score de 3 ó más puntos.

Recientemente, un estudio multicéntrico concluyó que los pacientes mayores de 60 años con un SOFA score superior a 9 durante más de cinco días tienen nula supervivencia (107).

3.4. Valoración del grado de estrés metabólico

Se valoró el grado de estrés según parámetros metabólicos, mediante una modificación de la gradación propuesta por Cerra y cols. (178)

Grado de estrés	0	1	2	3
Nitrógeno ureico (g/día)	<5	5-10	10-15	15-20
Glucemia (mg/día)	100 ± 20	150 ± 25	200 ± 25	250 ± 50
Resistencia a la insulina	No	No	No/Si	Si
Indice de consumo de O₂ (ml/mn.m²)	90 ± 10	130 ± 10	140 ± 10	160 ± 10
Cociente respiratorio	0,7	0,85	0,85	0,85-1

García de Lorenzo, 2005

3.5. Valoración de la ingesta

3.5.1. Cuantificación de la ingesta

Se realizó mediante un método prospectivo, registrando diariamente el tipo, volumen y composición de la nutrición administrada por vía enteral ó parenteral.

3.5.2. Ajuste de la ingesta

Para valorar la medida en que el consumo de micronutrientes se ajustan a las recomendaciones se tomaron como referencia las recomendaciones de la ASPEN (135), y para las necesidades calóricas y proteicas se siguieron las recomendaciones de las *guidelines* de la ESPEN (179).

Se realizó un estudio comparativo tanto de la ingesta energética y de macronutrientes (hidratos de carbono, proteínas y grasas), como de vitaminas (A, E, C, B₁₂ y ácido fólico) y oligoelementos (Se, Cu, Zn, Mn) en función de las recomendaciones y requerimientos, calculando la razón ingesta real/requerimientos.

Tal como están diseñadas las recomendaciones dietéticas, en caso de las DRIs, éstas incluyen un margen de seguridad que cubre variaciones interindividuales, por lo cual, no necesariamente aquellas dietas con menores aportes de nutrientes pueden provocar estados de desnutrición. Es usual utilizar el valor de 2/3 de las mismas como límite arbitrario, por debajo del cual se consideraría un factor de riesgo para el nutriente específico (94).

Para conocer la calidad de la dieta aportada, se calculó:

- **Perfil calórico:** porcentaje de energía, respecto al total, aportado por los macronutrientes.

En función del ajuste a las recomendaciones de cada uno de los nutrientes con función AOX, se consideró dieta AOX suficiente si se cubría igual o más del 2/3 de las recomendaciones, en cada uno de los micronutrientes antioxidantes estudiados.

4. Determinaciones y técnicas analíticas

4.1. Toma de muestras

Una vez concluida la fase de estabilización hemodinámica, se realizó a todos los pacientes la extracción total de 20 ml de sangre a primera hora de la mañana, procedimiento que se repitió a los siete días del ingreso.

Una vez obtenida la muestra, se repartió en cuatro alícuotas:

a) 5 ml en tubos de vacío que contenían heparina de litio liofilizada (T Ferumo®, venojet) destinada al análisis de los biomarcadores de estrés oxidativo.

b) 10 ml repartidos en dos tubos con gelosa (Vacuette® Z serum Sep., Germany) para la obtención de suero destinado al análisis: bilirrubina, ácido úrico, proteínas totales, albúmina y las vitaminas B₁₂ y ácido fólico.

c) El resto se depositó en tubos que contenían EDTA/K₃ como anticoagulante (Vacuette® K3E, Germany), utilizada para la determinación de homocisteína plasmática total.

Posteriormente la sangre del primer tubo se centrifugó a 3000 r.p.m., durante 15 minutos a 4°C, para separar el plasma de los elementos formes. El plasma así obtenido, se transfirió a tubos ependorff de polipropileno con pipetas Pasteur de plástico, en condiciones de oscuridad, almacenándolas a -

80°C, hasta su posterior análisis. En el momento de proceder a las determinaciones las muestras se descongelaron en hielo.

En los tubos con gelosa, la sangre se dejó coagular durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 10 minutos y se procedió a su análisis.

Los tubos con EDTA/ K₃ se colocaron en hielo hasta su centrifugación a 3000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C y posterior análisis.

4.2. Determinaciones bioquímicas generales

Se determinaron albúmina, proteínas totales, bilirrubina, ácido úrico, cianocobalamina, ácido fólico y homocisteína total, todas ellas mediante técnicas de análisis habituales en los laboratorio de Bioquímica del Hospital Unversitario Virgen de las Nieves de Granada, siguiendo los procedimientos de control y calidad establecidos. Tabla 1.

Tabla 1. Magnitudes bioquímicas y métodos utilizados.

Analito	Método	Valores de referencia del hospital Virgen de las Nieves
Bilirrubina	Método diazoico Autoanalizador Hitachi MODULAR P (Roche Diagnostics, Germany)	0-1 mg/100ml
Ácido úrico	Test enzimático colorimétrico Autoanalizador Hitachi MODULAR P (Roche Diagnostics, Germany)	H: 3,0-7,0 mg/dl M: 0,8-1,2 mg/dl
Proteínas totales	Test enzimático colorimétrico Autoanalizador Hitachi MODULAR P (Roche Diagnostics, Germany)	6,0-7,5 g/dl
Albúmina	Test inmunoturbidimétrico Autoanalizador Hitachi MODULAR P (Roche Diagnostics, Germany)	3,4-5,5 g/dl
Cianocobalamina	Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), Elecsys 2010, MODULAR ANALYTICS E170 (ROCHE Diagnostics, Germany).	240-900 pg/dl
Ácido fólico	ECLIA, (Elecsys 2010 y MODULAR ANALYTICS E170 (ROCHE Diagnostics, Germany).	4,2-19,9 mg/dl
Homocisteína	Inmunoensayo de Polarización de fluorescencia (FPIA) (IMx® ABBOTT Laboratories S.A)	5-12 μ mol/l

4.3. Valoración del estrés oxidativo

Se determinaron tres biomarcadores genéricos de estrés oxidativo:

Grupos carbonilos (GC) (180) y peróxidos lipídicos (PL) (181), los cuales representan el daño a las proteínas y a los lípidos respectivamente. Capacidad antioxidante del suero (CAT) (182), ensayo que proporciona una medida global de la protección contra el daño oxidativo.

Se otras magnitudes bioquímicas: bilirrubina total, ácido úrico y proteínas totales, como antioxidantes endógenos.

Existen numerosos métodos para medir la magnitud en que ocurre el daño oxidativo en organismos vivos y su capacidad para protegerse de éste, y aunque muchos de ellos fueron descritos por primera vez a final de los años 80, son revisados continuamente para minimizar las interferencias. Sin embargo, ninguno de ellos puede ser considerado como *“gold estándar”* para la evaluación de estrés oxidativo.

Como en todos los biomarcadores en general, los métodos elegidos en nuestro estudio tienen ventajas e inconvenientes. Sin embargo, a pesar de las limitaciones de los mismos, hemos optado por ellos por la simplicidad de la determinación y porque dan información útil en el área de investigación de estrés oxidativo.

Para asegurarnos una buena reproducibilidad de los datos obtenidos en las determinaciones, cada muestra fue analizada por triplicado en diferentes diluciones, aceptando un error del 8%.

4.3.1. Grupos Carbonilos (GC): Se determinaron mediante un método espectrofotométrico, con 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH) (180).

A las muestras de suero se les adicionó una solución de 10 nM de 2,4- dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) en 10% de ácido trifluoroacético (15% de la concentración final).

Las proteínas se lavaron tres veces con 1 ml de una mezcla de etanol/acetato de etilo (1:1, V/V) para remover residuos libres de 2,4-DNPH. Las muestras fueron resuspendidas en guanidina 6M en ácido fórmico al 50%, durante toda una noche a temperatura ambiente.

El contenido en Carbonilos se cuantificó por absorbancia a 360 nm usando un coeficiente de extinción molar (ϵ) a $22,00 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.3.2. Hidroperóxidos Lipídicos (PL): Se determinaron por oxidación del hierro en presencia de xilenol orange (FOX reagent) (181).

El FOX reagent se preparó con 100 $\mu\text{mol/L}$ de xilenol orange, butirato de hidroxitolueno 4 mM, ácido sulfúrico 25 mM y sulfato ferroso amonio 250 μM .

Las muestras se mezclaron con 900 μL de FOX reagent y 35 μL de metanol y luego se incubaron a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Los viales se centrifugaron a 2400 x g durante 10 minutos. La absorbancia del sobrenadante se midió a 560 nm ($\epsilon = 4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.3.3. Capacidad Antioxidante Total (CAT) se midió usando el método colorimétrico ABTS (182).

El radical $ABTS^+$ 30 μM se obtuvo con una solución de ABTS 9×10^{-5} moles y una disolución de peroxidasa $1,5 \times 10^{-8}$ moles. Para la obtención del radical se añadió, en estricto orden, un tampón de glicina-HCL $ph=4.5$ 50 mM; la solución de ABTS, la disolución de la enzima y por último H_2O_2 . Luego se midió la actividad antioxidante de las muestras disueltas en el radical a diferentes concentraciones, a una longitud de onda de 414 nm.

El sistema se estandarizó con una solución de trolox. La unidad de actividad es la concentración de trolox que tiene su equivalente en capacidad antioxidante total a una solución 1 mM de sustancia bajo estudio. El rango de linealidad del ensayo es de 0 a 2,5 nM de Trolox.

5. Análisis estadístico de los datos

Para la expresión de los datos se ha utilizado la estadística descriptiva, indicándose los resultados de las variables numéricas como media aritmética y desviación estándar ($X \pm SD$) y mediana y los resultados de las variables categóricas en frecuencias absolutas y relativas (%).

Como paso previo a la ejecución de un modelo paramétrico o no, se aceptó la hipótesis de distribución normal mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov*.

En el estudio de los datos o variables numéricas, se han utilizado test de muestras independientes en las comparaciones entre los grupos y test para muestras relacionadas, que han permitido evaluar la significación estadística del cambio

producido en las distintas variables numéricas durante el estudio.

Para todo ello, se ha utilizado el análisis estadístico de la varianza (ANOVA), habiéndose empleado test de la *t de Student* para los métodos paramétricos, tanto en el caso de muestras independientes, como de muestras relacionadas; el test de *Kruskal-Wallis* para los no paramétricos de muestras independientes; y el *test de Willcoxon*, como test no paramétrico para muestras relacionadas.

Para estudiar los datos o variables categóricas y establecer comparaciones entre los grupos, se ha empleado el test de *Mann-Whitney*, ya que debido al carácter cualitativo de dichas variables no podemos asumir normalidad.

Dentro de cada grupo, para el estudio del cambio de las variables categóricas, se ha utilizado el test de *Mc Nemar*.

El análisis de regresión lineal se utilizó para la búsqueda de correlaciones bivariadas, utilizando el coeficiente de correlación de *Pearson*.

La interacción entre las variables cualitativas y cuantitativas se evalúa mediante un modelo lineal general.

La estimación del grado de asociación entre cada uno de los parámetros plasmáticos analizados y los resultados clínicos se realizó mediante un análisis de regresión logística.

Todos los análisis se realizaron con la versión 12.0 de un paquete estadístico para Ciencias Sociales SPSS Inc. (Chicago IL., USA). Se consideran las diferencias significativas para un nivel de probabilidad del 5%.

IV. RESULTADOS

1. Características de la muestra

La muestra estuvo constituida por 60 pacientes, 73% varones. La edad media fue de 61 ± 15 años (rango: 27- 80).

La tabla 1 muestra las características basales de los pacientes, en la que puede observarse que el número de hombres predomina sobre el de mujeres.

De las patologías, las respiratorias fueron las más frecuentes. Cabe destacar que las puntuaciones medias de morbilidad no superan los límites en los que la supervivencia es nula, sin embargo la mortalidad en UCI fue del 47%.

Tabla 1. Características basales de los pacientes del estudio

Características	Valores (media \pm DE)
Edad (años)	61 \pm 15,9
Sexo (hombres/mujeres)	44/16
Diagnóstico	
<i>Cardiocirculatorio/IAM</i>	16
<i>Digestivo/enf. hepáticas</i>	5
<i>Pancreatitis</i>	5
<i>Peritonitis</i>	3
<i>Respiratorio/ SDRA</i>	26
<i>Neumonía</i>	5
Días de estancia en UCI	21 \pm 6
APACHEII (media \pm DE)	16 \pm 4
SOFA (media \pm DE)	8 \pm 3
Mortalidad hospitalaria(n/%)	28/47

2. Ingesta de energía y nutrientes (Tablas 2, 3)

El soporte nutricional comenzó a los 3 ± 2 días desde la admisión en UCI. El 6 % (4/60) de los pacientes recibió nutrición antes de las 48 horas después de la estabilización hemodinámica.

En cuanto al tipo de nutrición, el 58% de los pacientes recibió nutrición enteral exclusiva (NE), en todos los casos por sonda nasogástrica; el 25% nutrición parenteral por vía central (NP), y el 17% restante tuvo nutrición mixta (enteral a bajo ritmo de perfusión 20-40 ml/h, más parenteral periférica complementaria).

En la tabla 2 se detallan los valores medios y desviaciones estándar de la ingesta de energía y macronutrientes y los porcentajes de energía aportados por cada uno, respecto al total (perfil calórico).

Tabla 2. Consumo medio de energía y macronutrientes y perfil calórico

Energía y macronutrientes	Media \pm DE		Perfil calórico (%)	
	NE (n = 29)	NP y mixta (n = 31)	NE	NP
Energía (Kcal/ d)	1108 \pm 527	1692 \pm 325		
Proteínas (mg/d)	48 \pm 30	88 \pm 35	17	21
Hidratos de Carbono (mg/d)	179 \pm 86	200 \pm 120	65	47
Grasas (mg/d)	38 \pm 30	60 \pm 10	30	32

Puede observarse que los porcentajes de macronutrientes están dentro de los rangos aceptables de distribución recomendados

(10-35% de proteínas, 45-65% de hidratos de carbono y 20-35% de lípidos).

No obstante, los valores absolutos de energía y proteínas, tanto en pacientes alimentados con NP y mixta como los que recibieron NE, se alejan bastante del requerimiento medio calculado, valores que se cifran en 2000 Kcal/d y 120 g/día de proteínas.

La Tabla 3 muestra los valores medios y desviaciones estándar de la ingesta enteral y del aporte parenteral de micronutrientes antioxidantes en la que puede apreciarse que para todos los elementos estudiados se obtienen cifras muy inferiores a lo recomendado, a excepción de la vitamina B₁₂, que en la nutrición enteral se acerca a los requerimientos, y el Zn, cuyo aporte parenteral se ajusta a lo recomendado.

Tabla 3. Consumo medio de micronutrientes

Micronutrientes	Media \pm DS		Recomendaciones de la ASPEN (135)	
	NPT y mixta	NE	NPT	NE
Vitamina A ($\mu\text{g/d}$)	351 \pm 245	401 \pm 125	1000	900
Vitamina E (mg/d)	5,78 \pm 6	7,98 \pm 4	10	15
Vitamina C (mg/d)	54 \pm 35	61 \pm 27	90	90
Vitamina B12 ($\mu\text{g/d}$)	2 \pm 1,2	2.1 \pm 2	5	2.4
Ácido fólico ($\mu\text{g/d}$)	274 \pm 270	280 \pm 120	400	400
Zinc (mg/d)	4,7 \pm 4,9	3,9 \pm 2,1	5	11
Selenio ($\mu\text{g/d}$)	23 \pm 21	28 \pm 12	60	55
Cobre ($\mu\text{g/d}$)	1,5 \pm 1,7	1,8 \pm 0,9	5	9

3. Ajuste de la ingesta media a las recomendaciones

La tabla 4 muestra el porcentaje de ajuste a las recomendaciones de la ASPEN y la Tabla 5 el porcentaje de pacientes con ingestas deficientes.

Tabla 4. Ajuste a las ingestas recomendadas

	Adecuación a las recomendaciones (%)	
	NP y mixta	NE
Energía	84	55
Proteínas	73	40
Vitamina A ($\mu\text{g/d}$)	53	35
Vitamina E (mg/d)	44	58
Vitamina C (mg/d)	61	60
Vitamina B₁₂ ($\mu\text{g/d}$)	40	87,5
Ácido fólico ($\mu\text{g/d}$)	68	70
Zinc (mg/d)	94	35
Selenio ($\mu\text{g/d}$)	38	50
Cobre ($\mu\text{g/d}$)	30	20

Los resultados obtenidos en el aporte enteral de energía no superan el 60 % de los requerimientos establecidos, mientras que la NP aportó un 84% de las necesidades estimadas.

En cuanto a la ingesta enteral de proteínas, los valores obtenidos son claramente inferiores a lo recomendado (40%). Sin embargo, la administración parenteral de nitrógeno representó un 73% de los requerimientos proteicos estimados.

Según los resultados obtenidos para las vitaminas, se observa tanto en el aporte enteral como parenteral y mixto, que de las vitaminas hidrosolubles, sólo ácido fólico tienen valores medios

superiores a los 2/3 de las recomendaciones, destacando el aporte enteral de vitamina B₁₂ con valores cercanos a las recomendaciones. En cambio, ninguna de las vitaminas liposolubles supera el 60% de las recomendaciones.

Con respecto a los elementos traza, salvo el Zn, en ninguno de ellos se obtuvieron valores medios superiores al 50% de las recomendaciones.

Al estudiar como se distribuyen los pacientes según la adecuación a las recomendaciones (Tabla 5), se observan importantes desviaciones para todos los elementos analizados. Especialmente para los oligoelementos, en donde el Zn y el Cu presentaron un 70% y 74% de pacientes con ingestas inferiores a 1/3 de lo recomendado, respectivamente.

En lo referente al aporte de vitaminas, las mayores desviaciones se observan para la vitamina A y E, con sólo un 15% y 20% de pacientes que cubrieron las recomendaciones. Destaca la vitamina B₁₂, para la cual un 83% de pacientes alcanzaron las ingestas recomendadas.

Tabla 5. Distribución del porcentaje de pacientes según su ajuste a las recomendaciones

Micronutrientes	> 1/3 de las recomendaciones	> 2/3 de las recomendaciones	> recomendado
Vitamina A	57	85	15
Vitamina E	63	80	20
Vitamina C	13	39	61
Vitamina B12	8	17	83
Ácido Fólico	33	65	35
Selenio	59	80	20
Cobre	74	85	15
Zinc	70	82	18

4. Cambios en las variables clínicas (Tabla 6)

La gravedad valorada por el *SOFA score* pone de manifiesto un aumento significativo de la morbilidad de los pacientes a la semana de estudio (Tabla 6).

Por otro lado, en cuanto a los niveles plasmáticos de los antioxidantes endógenos estudiados destacan aumentos significativos en las cifras de bilirrubina y proteínas totales, observándose una reducción de las de ácido úrico.

La homocisteína es otro parámetro que experimentó aumentos significativos junto a la vitamina B₁₂, mientras que los niveles

plasmáticos de ácido fólico disminuyeron con respecto a los valores encontrados al inicio del estudio.

Los valores de homocisteína plasmática propuestos como normales (183) se sitúan en 12 $\mu\text{m}/\text{l}$ por lo que, según nuestros resultados, el 55% de los pacientes estudiados presentó hiperhomocisteinemia (HH) al cabo de una semana de seguimiento.

Tabla 6. Evolución de las variables clínicas durante el período de estudio

	Valores basales (Media \pm D.E.)	Valores día 7 (Media \pm D.E.)
SOFA score	6,55 \pm 2,77	7,58 \pm 3,53*
Bilirrubina (mg/l)	1,07 \pm 1,68	2 \pm 1,37*
Proteínas totales (mg/l)	4,9 \pm 0,61	5,03 \pm 0,63
Ácido úrico (mg/l)	5,22 \pm 3,10	4,11 \pm 2,84*
Homocisteína ($\mu\text{mol}/\text{l}$)	12,00 \pm 9,16	14,03 \pm 9,73*
Vitamina B ₁₂ (pg/dl)	924 \pm 501	977 \pm 500
Ácido fólico (mg/dl)	6,65 \pm 5,22	6,53 \pm 4,30

*P < 0,05, diferencias significativas entre basal y día 7.

5. Cambios en los biomarcadores de estrés oxidativo (Tabla 7, Figura 1)

Todos los marcadores de estrés oxidativo cuantificados experimentaron cambios significativos a lo largo del período de estudio (Tabla 6), de forma que los niveles de peróxidos lipídicos y

grupos carbonilos se incrementaron en un 27 y 22% respectivamente, mientras que la capacidad antioxidante total sufrió un reducción del 29% comparada con sus niveles basales .

Tabla 7. Valores medios basales y al séptimo día de estudio de los biomarcadores estudiados

Biomarcador	Nivel basal (Media \pm D.E.)	Día 7 (Media \pm D.E.)
Peróxidos lipídicos (nm/mg de proteína)	2,19 \pm 1,31	2,79 \pm 1,72*
Grupos carbonilos (nm/mg de proteína)	2,70 \pm 1,26	3,31 \pm 1,29*
Capacidad antioxidante total (meq.trolox)	1,35 \pm 0,80	0,96 \pm 0,63*

* $p < 0,05$ diferencias significativas entre niveles basales y día 7.

6. Análisis de regresión lineal

Se halló una correlación significativa entre los biomarcadores de estrés oxidativo, ingesta de nutrientes antioxidantes y antioxidantes endógenos (bilirrubina, ácido úrico y proteínas totales) (Tabla 8).

Tabla 8. Coeficientes de correlación (r_2) entre ingesta antioxidante, antioxidantes endógenos.

Variables	Peróxidos lipídicos	Grupos carbonilos	Capacidad antioxidante total
Ingesta antioxidante	0,252*	0,475*	0,457*
Proteínas totales	-	-	0,533*
Bilirrubina	-	-	0,355*
Ácido úrico	-	-	0,388*
Peróxidos lipídicos		-	0.284*
Grupos carbonilos	-		0.270*
Capacidad antioxidante total	0.284*	0.270*	

* $p < 0,05$

(-) valores no significativos

El análisis de la correlación entre el incremento (al cabo de siete días) de GC y de LP reveló falta de asociación; asimismo ambos marcadores se correlacionan negativamente con la CAT.

También se observó una asociación positiva entre la CAT y antioxidantes endógenos como proteínas totales, bilirrubina y ácido úrico.

Por su parte, la homocisteína presentó una correlación significativa con los biomarcadores de estrés oxidativo y la ingesta

de vitaminas B₁₂ y ácido fólico. Sin embargo no se encontró asociación de éstos con las concentraciones séricas de las vitaminas estudiadas (Tabla 9).

Tabla 9. Coeficientes de correlación (r_2) entre homocisteína, vitaminas B₁₂ y ácido fólico y biomarcadores de estrés oxidativo.

Variables	Peróxidos lipídicos	Grupos carbonilos	Capacidad antioxidante total	Ingesta de vitamina B ₁₂	Ingesta de ác. fólico
Homocisteína	0,651*	0,580*	0,537*	0,436*	0,518*
Vitamina B ₁₂ en plasma	-	-	-	-	
Ácido fólico en plasma	-	-	-		

7. Análisis bivariado y regresión logística

En función del ajuste a las recomendaciones de cada uno de los nutrientes con función AOX, se consideró dieta AOX suficiente si se cubría igual o más del 66% de las recomendaciones, en cada uno de los micronutrientes antioxidantes estudiados, por lo que se encontraron 26 pacientes (47%) con dieta AOX suficiente y 34 (53%) con dieta AOX insuficiente.

Las características de ambos grupos se detallan en la tabla 10 y en la Tabla 11 se resumen los principales cambios clínicos nutricionales durante el período de estudio.

Los resultados obtenidos revelan que no existen diferencias significativas al ingreso entre los grupos, en ninguna de las variables analizadas y que a la semana de estancia solo el SOFA score presentó cambios con significación estadística.

Tabla 11. Evolución de las características tras una semana de estudio

VARIABLES	Grupo con ingesta AOX suficiente (n = 26)	Grupo con ingesta AOX deficiente (n = 34)	p
Días de ventilación mecánica	4.0 ± 4.7	3.8 ± 2.2	NS
Media de la diferencia de SOFA (m ± DE)	0.77 ± 1	1.48 ± 2.14	0.035
Tipo de Nutrición			
Parenteral total (%)	56(5)	20 (6)	NS
Enteral (%)	33 (3)	55 (17)	
Mixta (enteral y parenteral) (%)	11 (2)	25 (7)	
Energía (media ± DE)	1299 ± 708	1081 ± 495	NS
Nitrógeno (m ± DE)	11.82 ± 10.35	7.16 ± 5.41	NS
Carbohidratos (m ± DE)	180 ± 91	182 ± 83	NS
Grasas (m ± DE)	47 ± 31	35 ± 27	NS

m: media

El análisis de las diferencias entre la ingesta de nutrientes antioxidantes y los biomarcadores de estrés oxidativo (Tabla 12) muestra interacciones entre ingesta y período de estudio para los peróxidos lipídicos (Figura 2A), los grupos carbonilos (Figura 2B) y la capacidad antioxidante total (Figura 2C), reflejando que las diferencias encontradas en cada uno de ellos se deben a una ingesta deficiente.

Tabla 10. Interacciones observadas en el análisis de la varianza entre ingesta, período de estudio y homocisteinemia para cada uno de los biomarcadores de estrés oxidativo.

	Peróxidos lipídicos	Grupos carbonilos	Capacidad antioxidante total
Ingesta antioxidante por período de tiempo	P = 0,026	P = 0,035	P = 0,018
Homocisteinemia por período de tiempo	P = 0,037	P = 0,020	P = 0,034

Figura 2 a. Interacciones entre la ingesta y el período de estudio para peróxidos lipídicos

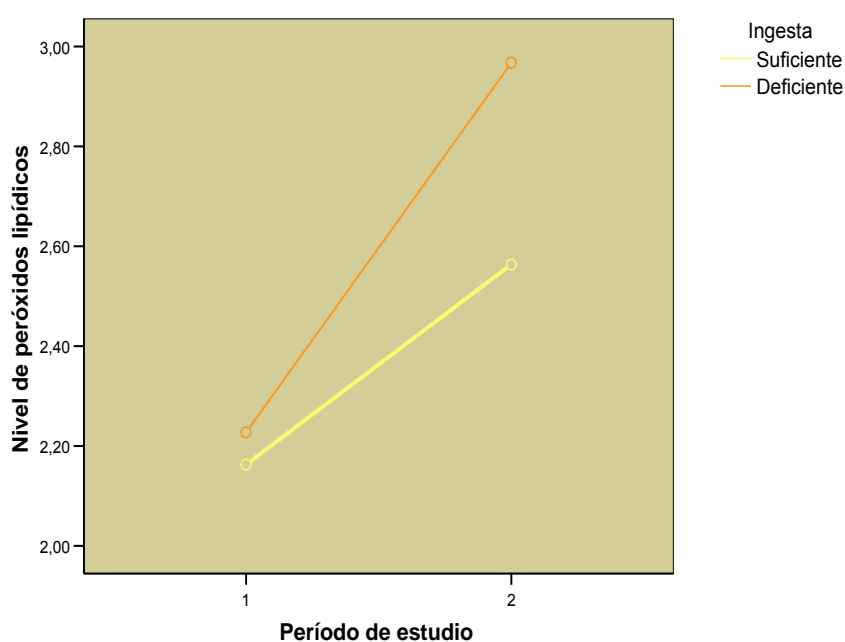
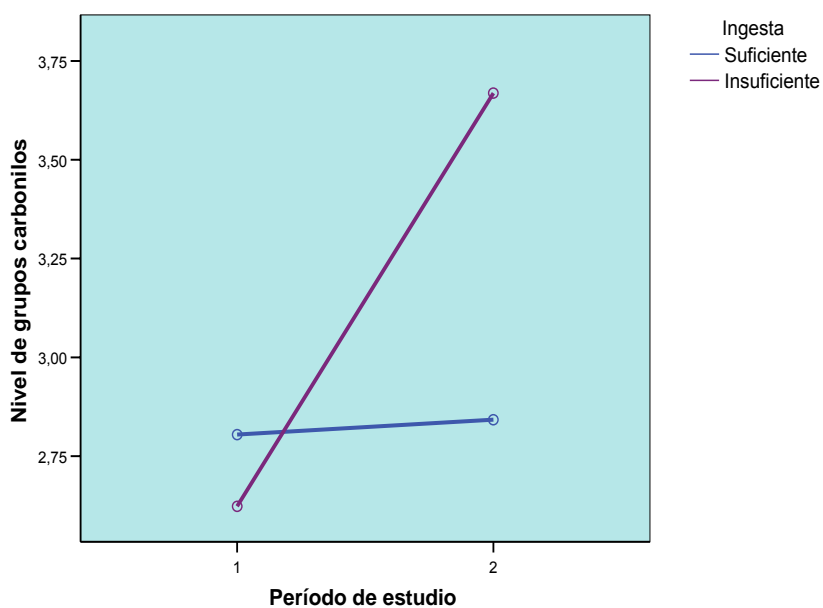
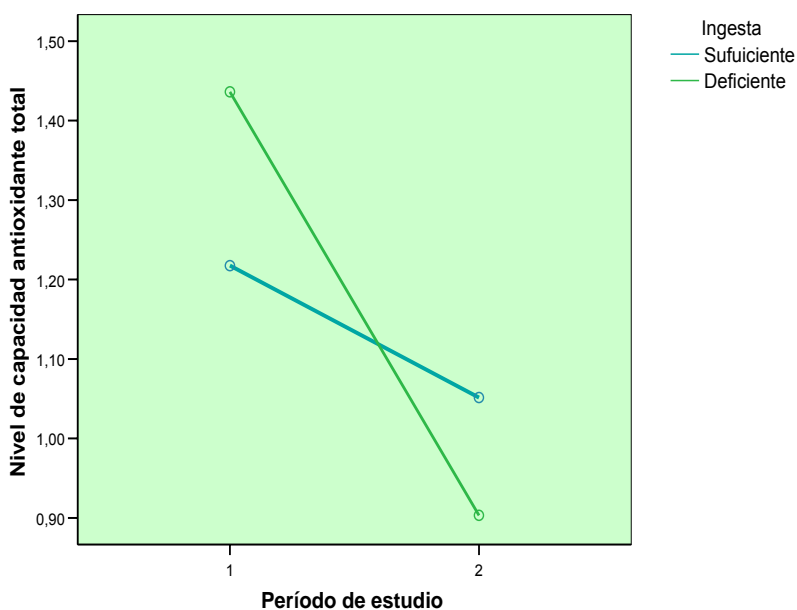


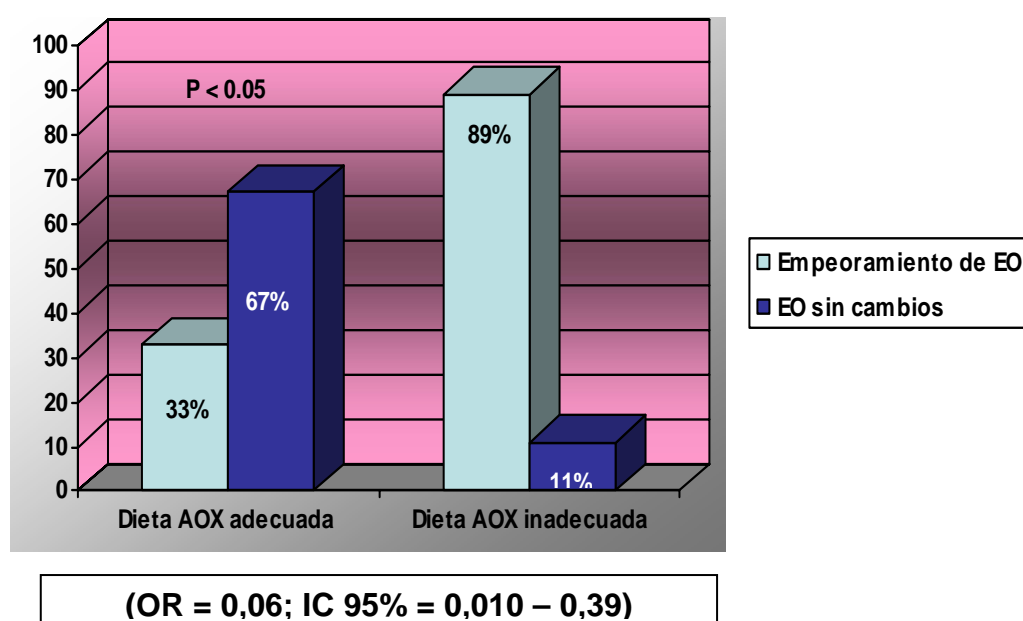
Figura 2 b. Interacciones entre ingesta y período de estudio para grupos carbonilos**Figura 2 c. Interacciones entre ingesta y período de estudi para capacidad antioxidante total**

Es de destacar que el 89% de los pacientes con ingestas AOX deficientes sufrió un empeoramiento del estrés oxidativo (definido como el aumento de uno de los dos marcadores de oxidación lipídica

y/o proteica y la disminución de la capacidad antioxidante total). Mientras que en aquellos pacientes cuyas ingestas fueron suficientes sólo el 33% empeoró el estado de estrés oxidativo (figura 3).

Por tanto, un aporte de nutrientes con efecto AOX adecuado a las recomendaciones, disminuye el riesgo de empeorar la situación de EO en un 94% ($p < 0,05$).

Figura 3. Asociación entre dieta antioxidante y empeoramiento del estrés oxidativo



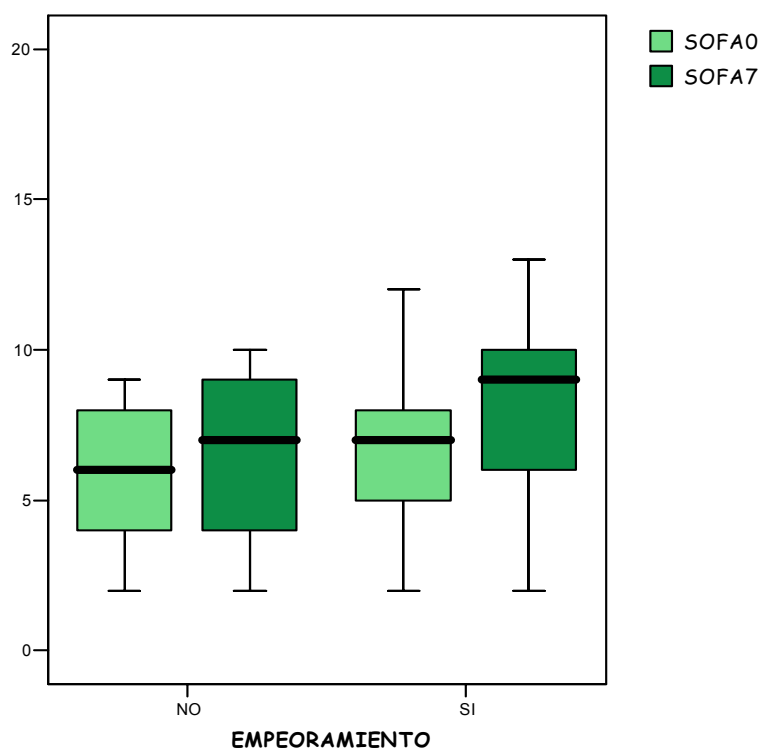
En cuanto a los cambios en la homocisteína plasmática y los biomarcadores de estrés oxidativo a la semana de estancia en UCI, el análisis de las interacciones denota la influencia de los niveles de homocisteína sobre el estrés oxidativo. A su vez, también se observó el influjo de la ingesta de vitaminas B₁₂ y ácido fólico sobre la hiperhomocisteinemia (Tabla 10).

Con respecto a la gravedad, en el análisis bivariado los pacientes que sufrieron un empeoramiento del estrés oxidativo, tuvieron un incremento significativo del valor medio de la puntuación

del SOFA al séptimo día (de 6,7 a 8,27; $p < 0,05$). Sin embargo no hubo modificaciones significativas en el SOFA score, en aquellos en los que el estrés oxidativo se mantuvo sin cambios (figura4).

Mediante un análisis de regresión logística se ha establecido el nivel de asociación entre la gravedad valorada por el SOFA score, la ingesta antioxidante, el estrés oxidativo y las concentraciones plasmáticas de homocisteína, destacando que sólo se mantuvo como variable independiente la homocisteinemia (OR= 0.314; 95% CI = 0,001 – 0,232) y que, en cambio, la ingesta antioxidante y el estrés oxidativo perdieron la significación.

Figura 4. Cambios en la puntuación SOFA, según empeoramiento del estrés oxidativo.



Es decir, la morbilidad en los pacientes al cabo de una semana de estancia es significativamente diferente para aquellos pacientes que tienen mayores niveles de homocisteína plasmática,

independientemente del estrés oxidativo y de la ingesta de nutrientes antioxidantes

V. DISCUSIÓN

1. Sobre la ingesta de energía y nutrientes y su ajuste a las recomendaciones

En los pacientes críticos el estado hipermetabólico y la proteólisis acelerada del músculo esquelético, particularmente si se combina con una malnutrición preexistente, lleva a una marcada inmunosupresión, debilidad muscular y aumento del riesgo de infección nosocomial (184).

La indicación del soporte nutricional artificial en estos pacientes es incuestionable y un aporte deficiente de energía puede llevar a malnutrición con consecuencias adversas que incluyen mayor tasa de complicaciones y mayor estancia en UCI (184).

En nuestro estudio, el tiempo en que se empieza a nutrir al paciente y el tipo de nutrición aportada, coincide con la práctica descrita por Montejo et al. (185), quienes estudiaron las complicaciones relacionadas con la nutrición enteral en pacientes críticos, dando una visión general de las prácticas de nutrición en las UCIs españolas.

1.1. Energía y proteínas

El aporte parenteral de energía y proteínas fue adecuado a los requerimientos calculados. Sin embargo en los pacientes que recibieron NE, la ingesta energética media no alcanzó el 60% de lo recomendado. Este resultado es consistente con otros publicados anteriormente (186-191). Mc Clave et al. (186) evaluaron el aporte de nutrición enteral en pacientes de UCI, observando que solo se prescribía el 66% de los requerimientos energéticos y que solamente se aportaba el 78% de lo prescrito. Adam y Bastón (187) y Eberner et al. (188) hallaron un resultado similar. Por otra parte, Reid y Campbell (189) encontraron asociación entre el déficit del aporte energético y el tiempo de estancia en UCI.

La mayoría de los estudios que han documentado ingestas insuficientes de energía en pacientes críticos, han utilizado la vía enteral.

Existen numerosos factores que impiden una alimentación enteral suficiente en estos pacientes.

Entre el 50-60% de los pacientes críticos presentan retardo del vaciamiento gástrico. La etiología de una anormal actividad motora del tracto gastrointestinal superior probablemente refleje una comorbilidad preexistente, aporte de fármacos (especialmente narcóticos o catecolaminas), alteraciones electrolíticas junto con hiperglucemia, cirugía reciente, shock, aumento de citocinas circulantes, etc. (192).

El fracaso intestinal es la resultante de una compleja situación en la que intervienen neutrófilos, el óxido nítrico, las citocinas, la acidosis y la depleción del ATP, entre otros.

La situación clínica del paciente crítico puede generar una disfunción intestinal donde el reflujo gastroesofágico, la gastroparesia, la disminución de la perfusión de la mucosa, la colonización bacteriana, el deterioro del tránsito intestinal y el deterioro de la capacidad de absorción del intestino son posibles factores que contribuyen a la intolerancia a la NE (193, 194).

1.2. Micronutrientes

Con respecto a las vitaminas y minerales AOX, nuestros resultados indican que las ingestas medias diarias son insuficientes en todos los casos, tanto en NE como en NP y mixta, con valores que, salvo la vitamina B₁₂ (en NE) y el Cinc (en NP) no alcanzan los 2/3 de las recomendaciones.

Esto se relaciona, por un lado, con los bajos volúmenes de NE aportados, ya que la composición de la mayoría de las fórmulas enterales está diseñada para proporcionar el 100% de las recomendaciones de la ASPEN de vitaminas y oligoelementos en 2000 ml de producto. Por otro lado, cabe destacar que, aunque el aporte energético/proteico por la vía parenteral fue suficiente, en la preparación de ésta se incorporan los oligoelementos y multivitaminas, pero en días alternos.

Los micronutrientes son de especial importancia en el paciente gravemente enfermo. Sus funciones nutricionales se conocen desde hace décadas y, actualmente, las no nutricionales, como la función antioxidante y la inmunitaria se consideran por lo menos tan importantes como las nutricionales.

2. Sobre los biomarcadores de estrés oxidativo

Nuestro grupo de pacientes evidenció un claro incremento de los niveles plasmáticos de los biomarcadores de estrés oxidativo al cabo de una semana de estancia en UCI.

Nuestros hallazgos confirman y extienden los resultados descritos por otros autores, que han demostrado un aumento del EO en pacientes con SRIS (139-141), sepsis (142-146), shock séptico (147, 148), SDRA (149-156) y población mixta de UCI (157-161).

En general estos estudios demostraron que en la población de pacientes críticos disminuyen los AOX séricos, mientras aumentan los marcadores de EO. Además, encontraron que altos niveles de EO se asociaron al fracaso multiorgánico, con incremento de la morbilidad e incluso alta mortalidad.

2.1. Peróxidos lipídicos

Las especies reactivas de oxígeno reaccionan con todo tipo de sustratos. Su interacción con los ácidos grasos poliinsaturados constituyentes de membranas celulares lleva a una peroxidación lipídica, con incremento de los peróxidos lipídicos plasmáticos y destrucción de la membrana celular (194).

Nuestros resultados muestran un incremento en los valores plasmáticos de PL con respecto a los registrados el día de ingreso en la UCI.

La oxidación de los lípidos genera radicales peroxilos que, además de combinarse con otros o atacar a las proteínas de las membranas, son capaces de sustraer hidrógeno del ácido graso adyacente de la membrana y, así, propagar la cadena de reacciones de lipoperoxidación. Además, los productos de bajo peso molecular escapan de la membrana y causan alteraciones a distancia (195). Argüelles et al. (196) estudiaron la relación entre marcadores básicos de estrés oxidativo en suero y tejidos de ratas, tratadas previamente para inducir cambios en su estrés oxidativo, y encontraron una correlación estadísticamente significativa entre los valores de PL del suero y los de los tejidos, lo que sugiere que este marcador en suero podría ser utilizado para predecir lo que pasa a nivel tisular.

2.2. Grupos carbonilos

Las proteínas también han sido sometidas al daño oxidativo de los radicales libres, generando un aumento en las concentraciones de grupos carbonilos en nuestro grupo de pacientes. Algunos aminoácidos carboxilados pueden convertir sus grupos carboxilos en grupos carbonilos por acción de los radicales libres, lo que los hace mucho más susceptibles a la degradación proteolítica. No obstante,

hay una variedad de rutas metabólicas a través de las cuales se forman los GC de las proteínas y no todos dependen de una modificación directa de las proteínas (197). La determinación de GC en complejos biológicos puede no ser apropiada para examinar los efectos específicos en las proteínas expuestas a las ERO. Sin embargo, debido a que los GC son formados por mecanismos oxidativos, es probable que su cuantificación proporcione un índice razonable del estado de EO. En el trabajo de Argüelles et al. citado anteriormente, se describe una débil correlación entre GC del suero y los de diferentes tejidos, lo que indica que su determinación sólo mide el daño oxidativo producido en las proteínas séricas.

La baja asociación observada entre GC y PL podría ser explicada por lo ya expuesto, mientras que los PL indican daño oxidativo en general, tanto en tejidos como en suero; los GC sólo dan información de lo que sucede en el suero.

2.3. Capacidad antioxidante total

La reducción de los antioxidantes es otro componente de la respuesta biológica a la presencia de ERO. En nuestro estudio se observó una disminución media del 27% en la CAT del suero.

Diferentes tipos de antioxidantes tienen un papel importante en el sistema de defensa del organismo frente a la generación de ERO. Sustancias como el ascorbato, α -tocoferol, proteínas tioles, bilirrubina y ácido úrico actúan como mecanismos de defensa contra el daño oxidativo en fluidos corporales, por lo que la determinación de la capacidad antioxidante total del suero nos da una medida de los efectos aditivos de diferentes moléculas antioxidantes endógenas.

El análisis de la correlación entre las moléculas del suero que actúan como secuestrantes de radicales (albúmina, ácido úrico,

bilirrubina y proteínas totales) y la CAT reveló asociaciones significativas. Las proteínas constituyen el principal componente antioxidante del suero. Los grupos sulfhidrilos libres de las proteínas son en su mayoría responsables de sus efectos antioxidantes.

Durante muchos años, los pigmentos de bilirrubina se consideraron como productos tóxicos formados durante el catabolismo hemo. Sin embargo, estudios recientes demostraron que la bilirrubina es un fuerte antioxidante fisiológico, que puede proporcionar una importante protección contra la aterosclerosis, las enfermedades coronarias y la inflamación. El ácido úrico es otro potente antioxidante que secuestra y reduce la actividad de los radicales. Ozcan Erel (198) desarrolló un método para medir la capacidad antioxidante total y encontró que las proteínas totales contribuyen en un 52,9 % a la capacidad antioxidante, la bilirrubina un 2,4% y el ácido úrico un 33,1%. En nuestro estudio, la contribución de cada molécula antioxidante a la CAT del suero refleja que el mayor aporte lo hacen las proteínas totales, seguidas del ácido úrico y la bilirrubina. Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cautela, ya que la bilirrubina y el urato pueden enmascarar una depleción de antioxidantes en algunas enfermedades.

La asociación entre la ingesta de micronutrientes antioxidantes y los biomarcadores de estrés oxidativo encontrada en nuestro grupo de estudio, sugiere que la dieta de estos pacientes tiene un importante papel en el estrés oxidativo.

3. Sobre las variables clínicas

3.1. Homocisteína plasmática

Nuestros datos revelan una elevada prevalencia de hiperhomocisteinemia en pacientes críticos. Sin embargo, Schindler

et al. (199) encontraron una prevalencia del 16% en una población de pacientes críticos. Esta diferencia podría deberse a que en dicho estudio, el punto de corte considerado como hiperhomocisteinemia fue de 14,4 $\mu\text{m/L}$ en comparación con 12 $\mu\text{m/L}$ que se consideró en el nuestro. Si bien la edad fue similar en ambos trabajos, la característica heterogeneidad de los pacientes de UCI y la posible presencia de otros condicionantes de hiperhomocisteinemia también pudo haber influido en las diferencias encontradas.

La presencia de altos niveles de hcy facilita el desarrollo de aterosclerosis e incrementa la mortalidad cardiovascular, principalmente porque su acumulación resulta en una proliferación de la musculatura lisa e interfiere con la función anticoagulante endotelial, por lo que es considerado un factor de riesgo importante para las enfermedades cardiovasculares (200).

Los resultados obtenidos con respecto a la asociación de la Hcy y la ingesta de folatos y vitamina B₁₂ sugieren una influencia de estas vitaminas en el metabolismo de éste aminoácido en nuestro grupo de estudio. Se sabe que los niveles circulantes de hcy dependen de la actividad de las reacciones que la metabolizan hasta metionina o a cisteína, para lo cual es esencial la intervención de micronutrientes como el ácido fólico, piridoxina y vitamina B₁₂

En un metaanálisis de 12 ensayos clínicos aleatorizados se demostró que la suplementación con ácido fólico (dosis desde 500 a 5000 μg) redujo las concentraciones de Hcy en un 25% con efectos similares entre ambas dosis (201).

La alta ingesta de folatos está asociada con un menor nivel de Hcy en adultos, independientemente de otros factores dietéticos o estilos de vida (202)

En este estudio no encontramos asociación de las bajas

ingestas dietéticas de folatos y vitamina B₁₂ con los valores plasmáticos de estas vitaminas, tal vez porque las determinaciones en plasma no reflejan deficiencia hasta que las concentraciones intraeritrocitarias descienden considerablemente, por lo que estos parámetros plasmáticos no son de mucha utilidad. Cabe destacar que algunos autores han propuesto que las concentraciones de Hcy se utilicen como marcador de déficit subclínico, tanto de folatos como de cobalaminas, en particular en aquellos individuos que presenten unas concentraciones de vitaminas próximas al límite de la normalidad (203). Ello es de gran interés, ya que la gravedad clínica del déficit de estas vitaminas no se correlaciona con sus concentraciones plasmáticas, y la detección de un exceso de Hcy puede indicar esta deficiencia antes de la aparición de manifestaciones clínicas graves, incluyendo la anemia y la afectación neurológica

En la mayoría de los estudios, existe una evidencia indirecta de que la hiperhomocisteinemia puede promover la formación de radicales libres. Esto está sustentado por correlaciones positivas entre las concentraciones plasmáticas de Hcy y LDL oxidada (126), o con productos finales de la peroxidación lipídica como por ejemplo malondialdehído (204) o F2-isoprostanos (205).

Nuestros resultados evidencian EO asociado a hiperhomocisteinemia, lo que podría exacerbar las consecuencias de una respuesta intravascular descontrolada.

4. Sobre la morbilidad y su asociación con estrés oxidativo, ingesta suficiente de antioxidantes e hiperhomocisteinemia.

En nuestro estudio no hemos encontrado asociación independiente entre la gravedad clínica determinada por el SOFA *score*, la dieta antioxidante y el empeoramiento del estrés oxidativo que presentaron los pacientes respecto al período inicial. Si bien en

el análisis bivariado se observa una asociación significativa, ésta pierde independencia al someterse a un análisis multivariante.

Nuestros resultados no coinciden con lo descrito por otros autores, que observaron una asociación entre el estrés oxidativo y la gravedad del paciente crítico. Hug et al. (206) demostraron una relación entre el inicio del fallo de órganos en la sepsis severa (APACHE II = 19.4) y el descenso del potencial antioxidante del plasma, sugiriendo que este potencial AOX se incrementa en respuesta a la lesión en aquellos pacientes que sobreviven, mientras que en los que mueren se mantiene permanentemente bajo. Presieret et al. (164) observaron un incremento de la actividad de radicales libres y de la excreción de nitritos hallando asociación entre la peroxidación lipídica y la disfunción orgánica en pacientes con shock séptico y APACHE II de 21.

Tal vez estas diferencias se deban a que estos investigadores incluyeron pacientes con una puntuación de los *scores* de gravedad mayores al observado en nuestra población de estudio, por lo que podrían tener peor pronóstico y por tanto una mala evolución, independientemente del mayor o menor grado de estrés oxidativo.

Existen estudios que al evaluar la capacidad antioxidante en pacientes sépticos y hemodializados revelaron paradójicamente una mayor capacidad antioxidante en suero, fenómeno que los autores explican por los altos valores de bilirrubina y ácido úrico encontrados en los pacientes evaluados (207, 208).

En nuestro grupo de estudio, el aumento significativo de la bilirrubina durante el período de estudio tal vez podría conferirle mayor capacidad antioxidante a pacientes con diferentes grados de gravedad, lo que ayudaría a interpretar el por qué los pacientes a pesar de empeorar el estrés oxidativo no están mas graves. En pacientes con enfermedades agudas, como los ingresados en la

Unidad de Cuidados Intensivos, los antioxidantes endógenos pueden enmascarar una depleción de la defensa antioxidante del organismo, ya que pueden aumentar considerablemente el ácido úrico o la bilirrubina como síntomas de un fracaso multiorgánico y, sin embargo, reflejar una capacidad antioxidante sérica mayor con respecto a su nivel basal.

Por otro lado, aunque una dieta antioxidante ajustada a las recomendaciones mostró una influencia en el empeoramiento del estrés oxidativo a lo largo del período de estudio, ésta no parece ser suficiente para ejercer efectos protectores con respecto a la morbilidad de los pacientes críticos. Si bien en el grupo que recibió 2/3 de las recomendaciones, los niveles de peróxidos lipídicos y grupos carbonilos no aumentaron significativamente con respecto a los pacientes con ingestas deficientes en nutrientes antioxidantes, éstos no parecen ser suficientes para reducir el daño y prevenir la mala evolución de estos pacientes.

Las recomendaciones de antioxidantes proponen cantidades mínimas para evitar deficiencias en personas sanas, pero no contemplan el aumento de las necesidades por la situación aguda-grave de los enfermos de la UCI

En los estudios realizados con suplementación antioxidante, las dosis utilizadas fueron, en algunos casos, más de diez veces de las recomendaciones, cuyos resultados revelaron que los elementos traza (particularmente selenio) y las vitaminas con función AOX administrados solos o en combinación con otros AOX, son seguros y pueden estar asociados con una reducción de la mortalidad en pacientes críticos.

Por su parte, el hallazgo de la influencia que ejerce la hiperhomocisteinemia sobre el estrés oxidativo y la gravedad de los pacientes críticos y su relación con ingestas deficientes de vitaminas

específicas (B₁₂ y ácido fólico) es de suma importancia de cara al abordaje del paciente crítico, en el cual se deberían monitorizar los niveles de homocisteína plasmática y suplementar con vitaminas, en caso de deficiencias. Cabe destacar que no hemos encontrado trabajos relacionados en este tipo de pacientes con respecto a la hiperhomocisteinemia y su relación con el estrés oxidativo.

El empleo de antioxidantes para paliar los efectos de las ERO se ha planteado desde que Harman postuló por primera vez que éstas ERO eran un factor causal del envejecimiento y enfermedades relacionadas (209). El exceso de ERO inducidos por factores exógenos, factores nutricionales o distintas patologías produce alteraciones en el ADN, en proteínas y/o en fosfolípidos de membrana. Es necesario tener en cuenta que la respuesta celular ante el desequilibrio entre ERO, y antioxidantes puede ser de muy diversa naturaleza, incluyendo estimulación o inhibición de distintas funciones celulares alteraciones en la ruta de señalización celular y en la expresión génica. Es por ello que el efecto de la suplementación con antioxidantes es difícil de predecir.

Al igual que las especies reactivas de oxígeno no actúan de forma general sobre todas las biomoléculas, ni tampoco todas ellas son igualmente susceptibles al daño oxidativo, los antioxidantes pueden actuar protegiendo determinadas vías y otras no.

Aún quedan por determinar cuáles son las dosis efectivas y seguras de una combinación de nutrientes antioxidantes en este tipo de pacientes. Nuestro mayor desafío es cambiar el concepto de dieta suficiente para adaptarlo a las verdaderas necesidades de los pacientes críticos.

El objetivo general de este trabajo ha sido determinar el estrés oxidativo de los pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y su modificación a la semana de estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos, valorando su asociación con los niveles de antioxidantes endógenos y exógenos y con la gravedad.

Tras el análisis y discusión de los resultados obtenidos podemos extraer las siguientes conclusiones:

Conclusión Primera:

La ingesta media de energía evaluada en los pacientes de estudio, cuando es a través de la vía enteral, no alcanza los 2/3 de las necesidades estimadas, mientras que por vía parenteral se llega al 84% de las mismas.

Conclusión Segunda:

En cuanto al perfil calórico, se ha observado un equilibrio adecuado al recomendado en las proporciones de ingesta de macronutrientes en los pacientes críticos estudiados.

Conclusión Tercera

Respecto a los micronutrientes, los valores medios de ingesta no alcanzan el nivel mínimo suficiente para evitar deficiencias según los requerimientos, a excepción de vitamina B₁₂ en NE y cinc en NP.

Conclusión Cuarta

Los pacientes críticos que padecían SRIS experimentaron cambios significativos en los biomarcadores de estrés oxidativo analizados durante su estancia en UCI.

Conclusión Quinta

La morbilidad de los pacientes incluidos en el estudio se incrementó (de manera significativa) a la semana de estancia en UCI.

Conclusión Sexta:

Se ha demostrado una asociación entre los biomarcadores de estrés oxidativo y los niveles de antioxidantes endógenos: bilirrubina, ácido úrico y proteínas totales.

Conclusión Séptima:

En el 57% de los pacientes se encontró una ingesta globalmente deficiente en nutrientes antioxidantes, lo que condicionó cambios significativos en los biomarcadores del estrés oxidativo durante el período de estudio. Dichos cambios no se observaron de manera significativa en los pacientes (43%) cuyos aportes antioxidantes alcanzaron 2/3 de las recomendaciones.

Conclusión Octava:

En cuanto a los niveles de homocisteína plasmática, se observó un 55% de pacientes con hiperhomocisteinemia, relacionada con ingestas deficientes de vitaminas B12 y ácido fólico, y con alteraciones en los biomarcadores de estrés oxidativo.

Conclusión Novena:

Los pacientes con hiperhomocisteinemia presentaron mayor morbilidad medida por el SOFA, independientemente de la ingesta global de antioxidantes y del estrés oxidativo.

CONCLUSION FINAL

En resumen, podemos afirmar que en los pacientes con SRIS hay un aumento del estrés oxidativo durante la estancia en UCI, asociado a bajos niveles de ingesta de nutrientes antioxidantes.

Aunque dicho incremento no empeora la situación clínica de los pacientes, tampoco la ingesta cercana a las recomendaciones ejerce un papel protector frente a la morbilidad, destacando que solo la hiperhomocisteinemia influye en la gravedad del paciente crítico.

Pensamos que se deberían adaptar las recomendaciones propuestas para NE y NP en enfermo crítico, estableciendo dosis mas adecuadas de nutrientes antioxidantes que cubran las necesidades según criterios específicos basados en un estudio individualizado del paciente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Van Haafden R, Haenen G, Evelo C, et al. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metab Rev.* 2003; 35: 215-253.
2. Namiki M. antioxidants/Antimutagens in food. *Food Sci Nutr.* 1992; 29:273-300.
3. Vicario IM. Peroxidación lipídica, antioxidantes de la dieta y enfermedad cardiovascular. *Nutr Clin.* 1997; 16: 19-28.
4. Dryden J. Amenaza de la lesión oxidativa. En: Marino PL, director. El libro de la UCI, 2ª Ed. Barcelona, España: Masson. 2000. p. 33-51.
5. Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1987; 25: 317-364.
6. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidans of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 280: 18.
7. Halliwell B. antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutr Rev.* 1997; 55: Suppl 1: 44-52.
8. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr Rev.* 1994; 52: 253-265
9. Larson RA. Naturally occurring antioxidants. Boca Ratón. Florida: CRC Press LLC; 1997.
10. Krinsky NI. Mechanisms of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992; 2000: 248-254.
11. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Investig.* 1991; 21: 361-374.
12. Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacol Res.* 2004; 49: 503-508.
13. Anderson BO, Brown JM, Harken A. Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury. *J Surg Res.* 1991; 51: 170-179.
14. Bernovsky C. Nucleotide chloramines and neutrophil-mediated cytotoxicity. *FASEB J.* 1991; 5: 295-300.

15. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30: 620-650.
16. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215: 213-219.
17. Papas AM. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids* 1996; 31 Suppl 1: 77-82.
18. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1995; 35: 21-39.
19. Watson WH, Cai J, Jones DP. Diet and apoptosis. *Ann Rev Nutr.* 2000; 20: 485-505.
20. Thérond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Met Care.* 2000; 3: 337-384.
21. Alvarez E; Ruiz-Gutierrez V; Santa-María C; Machado A. Age-dependent modification of lipid composition and lipid structural order parameter of rat peritoneal macrophage membranes. *Mech Ageing Dev.* 1993; 71: 1-12.
22. Putvinsky AV.; Sokolov AI.; Roshchukin DI.; Vladimirov YA. Electric breakdown of bilayer phospholipid membranes and the ultraviolet irradiation-induced lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1979; 106:53-55.
23. Pauls KP, Thompson JE. In vitro simulation of senescence-related membrane damage by ozone-induced lipid peroxidation. *Nature.* 1980; 283:504-506.
24. Benedetti A, Ferretti G, Curatola G, Jezequel AM, Orlandi F. Age and sex related changes of plasma membrane fluidity in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 156:840-845.
25. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem.* 1990; 15: 129-135.

26. Yoshikawa T, Murakami M, Takemura S, Kondo M. Effects of vitamin E on D-galactosamine-induced or carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Digestion*. 1982; 25: 222-229.
27. Ollinger K, Brunk UT. Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. *Free Radic Biol Med*. 1995; 19: 565-574.
28. Barrowcliffe TW, Gray E, Kerry PJ, Gutteridge JM. Triglyceride-rich lipoproteins are responsible for thrombin generation induced by lipid peroxides. *Thromb Haemost*. 1984; 52: 7-10.
29. Berlett BS, Stadtman E. Protein oxidation in aging; disease; and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997; 272: 20313-20316.
30. Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O. Modification of human low density lipoprotein by lipid peroxidation. *Basic Life Sci*. 1998; 49: 369-373.
31. Esterbauer H, Schau RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal; malondialdehyde and related aldehyde. *Free Radic Biol Med*. 1991; 11: 81-128.
32. Uchida K, Stadtman ER. Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc. Natl Acad Sci*. 1992; 89: 4544-4548.
33. Sayre LM, Arora PK, Lyer RS, Salomon RG. Pyrrole formation from 4-hydroxynonenal and primary amines. *Chem Res Toxicol*. 1993; 6:19-22.
34. Friguet B, Stadtman ER, Szewda LI. Modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Formation of cross-linked protein that inhibits the multicatalytic protease. *J. Biol Chem*. 1994; 269: 21639-21643.
35. Tsai L, Szewda PA, Binogradova O, et al. Structural characterization and immunochemical detection of a fluorophore derived from 4-hydroxy-2-nonenal and lysine. *Proc. Natl Acad Sci*. 1998; 95: 7975-7980.
36. Kim YG, Jeon DY, Yang MK. Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in the liver of guinea pig infected with *Leptospira interrogans*. *Free Radic Res*. 1997; 26: 1-6.

37. Burcham PC, Kuham YT. Introductions of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product; malondialdehyde. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 220: 996-1001.
38. Belkner J, Wiesner R, Rathman J, et al. Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipooxygenase. *Eur J Biochem.* 1993; 213: 251-261.
39. Jügens G, Lang J, Esterbauer H. Modification of human low-density lipoprotein by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-nonenal. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 875: 103-114.
40. Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease *Brain Pathol.* 1999; 9: 133-146.
41. Draper HH, Hadley M. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica.* 1990; 20: 901-907.
42. Gutteridge JM, Tickner TR. The characterization of thiobarbituric acid reactivity in human plasma and urine. *Anal Biochem.* 1978; 91: 250-257.
43. Gay C, Collins J, Gebicki JM. Determination of iron in solutions with the ferric-xylene orange complex. *Anal Biochem.* 1999; 273: 143-148.
44. Gupta BL. Microdetermination techniques for H₂O₂ in irradiated solutions *Microchem. J.* 1973; 18: 363-374.
45. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biol Med.* 1999; 26: 1034-53.
46. Uchida K, Satdtman ER. Covalent modifications of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate. *J Biol Chem.* 1993; 268: 6388-6393.
47. Burcham PC, Kukan YT. Introduction of carbonyl groups into proteins of the lipid peroxidation product, malondialdehyde. *Biochem Biophys Res Comm.* 1996, 220: 996-1001.
48. Requena JR, Fu MX, Ahmed MU et al. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dialysis Transplant.* 1996; 11: 48-53.

49. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev.* 1998; 30: 225-243.
50. Jacob RA. The integrated antioxidant system. *Nutr Res.* 1995 ; 15 : 755-766.
51. Guptasarma P, Balasubramanian D. Dityrosine formation in the proteins of the eye lens. *Curr Eye Res.* 1992; 11: 1121-1125.
52. Daneshvar B, Frandsen H, Autrup H et al. Gamma-glutamyl semialdehyde and 2-amino-adipic semialdehyde : biomarkers of oxidative damage to proteins. *Biomarkers.* 1997; 2: 117-123.
53. Daneshvar B, Frandsen H, Dragsted LO et al. Analysis of native human plasma proteins and haemoglobin for the presence of dityrosine by high-performance liquid chromatography. *Pharmacol Toxicol.* 1997; 81: 205-208.
54. Oliver JD, van der Wal FJ, Bullied NJ, et al. Interaction of the thiol dependent reductase Erp57 with nascent glycoproteins. *Science.* 1997; 275: 86-88.
55. Funabiki R, Takeshita K, Miura Y, et al. Dietary supplement of G-rutin oxidative damage in the rodent model. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 1078-1082.
56. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 899: 191-208.
57. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified protein. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464-478.
58. Burdon RH, Alliangana D, Gill V. Endogenously generated active oxygen species and cellular glutathione levels in relation to BHK-21 cell proliferation. *Free Radical Res.* 1994; 21: 121-134.
59. Feig DL, Loeb LA. Mechanisms of mutation by oxidative DNA damage: reduced fidelity of mammalian DNA polymerase β . *Biochemistry.* 1993; 32: 4466-4473.

60. Chaudny AK, Nokubo M, Reddy GR. Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science*. 1994; 265: 1580-1582.
61. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mut Res*. 1997; 387: 146-163.
62. Halliwell B. Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? *Free Radical Res*. 1998; 29: 469-486.
63. Roth E, Manhart N, Wessner B. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004; 71: 161-168.
64. Martínez Cayuela M, Sánchez de Medina Contreras F. Especies reactivas de oxígeno y defensa antioxidante. En Gil Hernández A, Ruiz López M, Sastre Gallego A, et. al. coordinadores. *Nutrición Clínica*. 1º ed. Madrid. MC Graw-Hill Interamericana; 2001. p. 91-111.
65. Lovatand R, Preiser JC. Antioxidant therapy in intensive care. *Curr Opin Crit Care*. 2003; 9: 266-270.
66. Holben DH, Smith AM. The diverse role of selenium within seleoproteins: a review. *J Am Diet Assoc*. 1999; 99: 836-43.
67. Gutteridge JMC. Antioxidant properties of the protein, ceruloplasmina, albumin and transferrin: A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Acta*. 1986; 869: 119-127.
68. Krinsky NI. Mechanisms of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992; 200: 248-254.
69. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990; 280: 18.
70. Das D, Tapryal N, Goswami SK. Regulation of ceruloplasmin in human hepatic cells by redox active copper: identification of a novel AP-1 site in the ceruloplasmin gene. *Biochem J*. 2007; 402 (1):135-4.

71. Nieto FJ, Iribarren C, Gross MD. Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis*. 2000; 148: 131-139.
72. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Med*. 2000; 29 (11): 1106-1114.
73. Kazuhiro Otani MD, Shuji Shimizu MD, Kazuo Chijiwa MD, et al. Increased urinary excretion of bilirubin oxidative metabolites in septic patients: a new marker for oxidative stress *in vivo*. *Journal of Surgical Research*. 2001; 96: 44-49.
74. Upston JM, Terentis AC, Stocker R. Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as potential antiatherogenic supplement. *FASEB J*. 1991; 13: 977-994.
75. Thomas SR, Neuzil J, Mohr D, et al. Coantioxidants make α -tocopherol and efficient antioxidant for low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr*. 1995; 62: 1357S-1364S.
76. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense system: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am J Clin Nutr*. 1991; 53 Suppl: 194-200.
77. Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, et al. Interaction among vitamin C, vitamin E and β -carotene. *Am J Clin Nutr*. 1995; 62 Suppl: 1322-1326.
78. Palace, V.P.; Khaper, N.; Quin, Q.; Singal, P.K. (1999) Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol. Med.* 26: 746-761
79. Rose RC. Ascorbic acid metabolism in protection against free radicals: A radiation model. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 169: 430-436.
80. Frei B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am J Clin Nutr*. 1991; 54: 1113-1118.
81. Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*. 1995; 62 Suppl: 1315 - 1321.

82. Hill KE, Montine TJ, Motley AK et al. Combined deficiency of vitamins E and C causes paralysis and death in guinea pigs. *Am J Clin Nutr.* 2003. 77: 1484-1488.
83. Scott JM, Weir DG. Folic acid; homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk.* 1998; 5: 223-227.
84. Bolander-Gouaille. Focus on Homocysteine and the Vitamins involved in its Metabolism. 2nd Edition. Springer. 2002.
85. Cano MJ, Ayala A, Murillo ML, et. al. Protective effect of folic acid against oxidative stress produced in 21-days postpartum rats by maternal-ethanol chronic consumption during pregnancy and lactation period. *Free Radic Res.* 2001; 34: 1- 8.
86. Lih-Brody L, Powel SR, Collier KP, et al. Increases oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 1996; 41: 2078- 2086.
87. Kumar KV, Rao SM, Gayani R, et al. Oxidant stress and essential fatty acids in patients with risk and established ARDS. *Clin Chim Acta* 2000; 111-120.
88. Flaring UB, Rooyackers OE, Wernerman J, et al. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. *Clin Sci.* 2003; 104: 275- 282.
89. Novak F, Heyland DK, Avenell A, et al. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med.* 2002; 30: 2022-2029.
90. RDI para tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, folato, vitamina B12, ácido pantoténico, biotina y colina (1998); RDI para vitamina C, vitamina E, selenio y carotenos (2000). www.nap.edu
91. RDI para vitamina A, vitamina K, arsénico, boro, cromo, cobre, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, níquel, silicio, vanadio y zinc (2001). www.nap.edu

92. Abuja PM. When might an antioxidant become a prooxidante? *Acta Anaesthesiol Scand.* 1998; 42 Suppl 112: 229-230.
93. Neuzil J, Darlow BA, Inder TE, et al. Oxidation of parenteral lipid emulsion by ambient and phototherapy lights: potential toxicity of routine parenteral feeding. *J Pediatr.* 1995; 126: 785-90.
94. Renwik AG, Flynn A, Fletcher RJ, et al. Risk-Benefit analysis of micronutrients. *Food and Chemical Toxicology.* 2004; 42 (12): 1903-1922.
95. Departamento de Nutrición. Tablas de ingestas recomendadas de energía y nutrientes para la población española. Universidad Complutense de Madrid. 1994
96. Lemineaur T, Deby-Dupont G, Presier JC. Biomarkers of oxidative stress in critically ill patients: What should be measured, when and how? *Curr Opin in Clinical Nut and Metabolic Care.* 2006.
97. Droge W. Oxidative stress in aging. *Adv Exp Med Biol Chem.* 2003; 267: 191-200.
98. Maxwell SRJ. Prospect for the use of antioxidant therapies. *Drugs.* 1995; 49: 345-361.
99. Opara EC. Role of oxidative stress in the etiology of type 2 diabetes and the effect of antioxidant supplementation on glycemic control. *J Invest Med.* 2004; 52: 19-23.
100. Ferrari CKB. Free radicals, lipids peroxidation and antioxidants apoptosis: implications in cancer, cardiovascular and neurological diseases. *Biologia.* 2000; 6: 579-588.
101. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984. 219: 1-14.
102. Montejo JC, García de Lorenzo A, Ortiz Leyba C, et al. *Manual de Medicina Intensiva.* 3ª Ed. Madrid, España. Harcourt. 2006.
103. Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med.* 1996; 24: 163-172.

104. Abraham E, Matthay MA, Dinarello ChA et al. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Crit Care Med* 2000; 28:232-5.
105. Bone RC, Balk RA, Cera FB, Dellinger P, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101 (6): 1644-1655.
106. Burcham PC. & Kuham YT. Introductions of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product; malondialdehyde. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. 220: 996-1001.
107. Cabre L, Mancebo J, Solsona JF, et al. Multicenter Study of the multiple study of the multiple organ dysfunction syndrome in intensive care units: the usefulness of sequential Organ failure Assesment scores in decision mking. *Intensive Care Med.* 2005; 31: 927-933.
108. García de Lorenzo y Mateos A, López Martínez J, Sánchez Castilla M. Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Med Intensiva.* 2000; 24:353-60.
109. Cartwright MM. The metabolic response to stress: a case of complex nutrition support management. *Crit Care Nurs Clin N Am.* 2004; 16: 467-487.
110. Reichlin S. Neuroendocrin-immune interactions. *N Engl J Med.* 1993; 397: 1246-1253.
111. García de Lorenzo y Mateos A, Ortiz Leyba C. Respuesta a la agresión: valoración e implicaciones terapéuticas. *Medicina Intensiva.* 1997; 21: 13-28.
112. Roberts S, Hamedani B. Benefits and methods of achieving strict glycemic control in the ICU. *Crit Care Nurs Clin N Am.* 2004; 16: 537-545.
113. Wernerman J, Hammarqvist F, Gamrin L, et al. Protein metabolism in critical illness. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1996; 10: 603-615.

114. Nitenberg G. Nutritional support in sepsis: still sceptical? *Curr Opin Crit Care*. 2000; 6: 253-266.
115. García de Lorenzo y Mateos A, López Martínez J, Sánchez Castilla M. Respuesta inflamatoria sistémica: *definiciones*, marcadores inflamatorios y posibilidades terapéuticas. *Med Intensiva*. 2000;24:361-70
116. Lovat R, Presier JC. Antioxidant therapy in intensive care. *Curr Opin Crit Care*. 2003; 9: 266-270.
117. Heyland D, Rupinder D. Oxidative stress in the critically ill: a preliminary look at the REDOX® study. *Critical Care Rounds*. 2006; 7 (1): 1-6.
118. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, et. al. Relationship between plasma homocysteine, vitamin status and extracranial carotid-artery stenosis in the Framingham study population. *J Nutr*. 1996; 126 (Suppl): 1258S-1265S.
119. Refsum H, Smith AD, Uleand PM, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clinical Chemistry*. 2004; 50: 13-32.
120. Refsum H, Uleand PM, Nygard O, et al. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med*. 1998; 49: 31-62.
121. Durand P, Lussier-Cacan S, Blache D. Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor activity in rats. *Lab Invest*. 1997; 13: 1157-68.
122. D'Angelo A and Sehub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood*. 1997; 90: 1-11.
123. Ullegaddi R, Powers HJ, Gariballa SE. Antioxidant supplementation with or without B-group vitamins after acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *JEPEN*. 2006; 30 (2): 108-114.
124. Faraci FM. Hyperhomocysteinemia: a million ways to lose control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003.

125. Loscalzo J. Oxidative stress: a key determinant of atherothrombosis. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31: 1059-1061.
126. Mc Cully KS. Chemical pathology of homocysteine I. Atherogenesis. *Ann Clin Lab Sci.* 1993; 23: 477-493.
127. Eaton E. The biochemical basis of antioxidant therapy in critical illness. *Proceeding of the nutrition society.* 2006; 65:242-249.
128. Galloway P, McMillan DC, Sattar N. Effect of the inflammatory response on trace element and vitamin status. *Ann Clin Biochem.* 2000; 37: 289-297.
129. Maehira F, Luyo GA, Miyagi L, et al. Alterations of serum selenium concentrations in the acute phase of pathological conditions. *Clin Chim Acta.* 2002, 316: 137.
130. Gaetke LM, Mc Clain CJ, Talwalkar RT, et al. Effects of endotoxin on zinc metabolism in human volunteers. *Am J Physiol.* 1997; 272: E952-E956.
131. Berger MM, Spertini F, Shenkin A, et al. Trace element supplementation modulates pulmonary infection rates after major burns: a double blind, placebo controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68: 365-371.
132. Berger MM, Spertini F, Shenkin A, et al. Trace element in trauma burns. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1998: 513-517.
133. Berger MM, Spertini F, Shenkin A, Revely JP, et al. Copper, selenium, zinc and thiamine balances during continuous venovenous hemodiafiltration in critically ill patients. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:410-416.
134. De Berranger E, Colinet S, Michaud L, et al. Severe selenium deficiency secondary to chylous loss. *J Parenter Enter Nutr.* 2006, 30: 173-174.
135. ASPEN. Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adults and pediatric patients. *JPEN.* 2002; 26:1SA-138S.

136. Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods*. 1999; 232: 3-14
137. Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical Nutrition*. 2005; 24: 172-183.
138. Crimi E, Sica V, Williams-Ignarro S, et al. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006; 40: 398-406.
139. Tsai K, Hsu T, Kong C, et al. Is the endogenous peroxyradical scavenging capacity of plasma protective in systemic inflammatory disorders in humans? *Free Radic Biol Med*. 2000; 28: 926-933.
140. Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, et al. Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*. 2003; 31: 1048-1052.
141. Alonso de Vega JM, Díaz J, Serrano E, et al. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*. 2002; 30: 1782-1786.
142. Ogilvie A, Groeneveld AB, Straub JP, et al. Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock. *Intens Care Med*. 1991; 17: 40-44.
143. Galley HF, Davies MJ, Webster NR. Xantine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. *Crit Care Med*. 1996; 24: 1649-1653.
144. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, et al. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med*. 1995; 23: 645-646.
145. Borreli E, Roux-Lombard P, Grau GE, et al. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med*. 1996; 24: 392-397.
146. Cowley HC, Bacon PJ, Goode HF, et al. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit Care Med*. 1996; 24: 1179-1183.

147. Strand OA, Leone A, Giercksky KE, et al. Nitric oxide indices in human septic shock. *Crit Care Med.* 2000; 28: 2779-2785.
148. Ohya M, Marukawa S, Inoue T, et al. Plasma nitrotyrosine concentration relates to prognosis in human septic shock. *Shock.* 2002; 18: 116-118.
149. Bowler RP, Velsor LW, Duda B, et al. Pulmonary edema fluid antioxidants are depressed in acute lung injury. *Crit Care Med.* 2003; 31: 2309-2315.
150. Sznajder JI, Fraiman A, Hall JB, et al. Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest.* 1989; 96: 606-612.
151. Baldwin SR, Simon RH, Grum CM, et al. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet.* 1986; 1: 11-14.
152. Carpenter CT, Price PV y Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest.* 1998; 114: 1653-1659.
153. Richard C, Lemonnier F, Thibault M, et al. Vitamin E deficiency and lipoperoxidation during adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1990; 18: 4-9.
154. Metnitz PG, Bartens C, Fischer M, et al. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intens Care Med.* 1999; 25: 180-518.
155. Quinlan GJ, Lamb NJ, Evans TW, et al. Plasma fatty acid changes and increased lipid peroxidation in patients with adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1996; 24: 241-246.
156. Kumar KV, Rao SM, Gayani R, et al. Oxidant stress and essential fatty acids in patients with risk and established ARDS. *Clin Chim Acta.* 2000; 111-120.
157. Alonso de Vega JM, Díaz J, Serrano E, et al. Plasma redox status relates to severity in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2000; 28: 1812-1814.

158. Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, et al. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2000; 28: 143-149.
159. Curran FJ, Sattar N, Talwar D, et al. Relationship of carotenoid and vitamins A and E with the acute inflammatory response in acute pancreatitis. *Br J Surg.* 2000; 87: 301-305.
160. Ritter C, Andrades M, Guerreiro M, et al. Plasma oxidative parameters and mortality in patients with severe burn injury. *Intens Care Med.* 2003; 29: 1380-1383.
161. Polidori MC, Mecocci P y Frei B. Plasma vitamins C levels are decreased and correlated with brain damage in patients with intracranial haemorrhage or head trauma. *Stroke.* 2001; 32: 898-902.
162. Heyland D, Dhaliwal R, Suchner U, et al. Antioxidant nutrients: a systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient. *Intensive Care Med.* 2005; 31: 27-337.
163. Nathens AB, Neff MJ, Jurkovich GJ, et al. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. *Ann Surg.* 2002; 236: 814-822.
164. Preiser JC, Van Gossum A, Berré J, et al. Enteral feeding with a solution enriched with antioxidant vitamins A, C and E enlases the resistance to oxidative stress. *Crit Care Med.* 2000; 28: 3828-3832.
165. Young B, Ott L, Kasarskis E, et al. Zinc supplementation is associated with improved neurologic recovery rate and visceral protein levels of patients with severe closed head injury. *J Neurotrauma.* 1996; 13: 25-34.
166. Maderazo EG, Woronick CL, Hickingbotham N, et al. A randomized trial of replacement antioxidant vitamin therapy for neutrophil locomotory dysfunction in blunt trauma. *J Trauma.* 1991; 31: 1142-1150.
167. Berger MM, Reymond MJ, Shenkin A, et al. Influence of selenium supplements on the post-traumatic alterations of the thyroid axis – a prospective placebo controlled trial. *Intensive Care Med.* 2001; 27: 91-100.

168. Porter JM, Ivatury RR, Azimuddin K, et al. Antioxidant therapy in the prevention of organ dysfunction syndrome and infectious complications after trauma: early results of a prospective randomized study. *Am Surg.* 1999; 65: 478-483.
169. Berger MM, Baines M, Wardle CC, et al. Influence of early trace element and vitamin E supplements on the plasma antioxidant status after major trauma: a controlled trial. *Nutr Res.* 2001; 21: 41-54.
170. Kuklinski B, Buchner M, Schweder R, et al. Akute Pancreatitis-eine "Free Radical Disease: letalitassenkung durch Natriumselenit (Na₂SeO₃)-therapie. *Z Gesamte Inn Med.* 1991; 46: 145-149.
171. Zimmerman T, Albrecht S, Kühne H, et al. Selensubstitution bei sepsispatienten-eine prospective randomisierte studie. *Med Klin.* 1997 ; 92 Suppl 3 : 3-4.
172. Angstwurm MWA, Schottdorf J, Schopohl J, et al. Selenium replacement in patients with severe systemic inflammatory response syndrome improves clinical outcome. *Crit Care Med.* 1999; 27: 1807-1813.
173. Berger MM, Baines M, Wardle CA, et al. Trace element supplements modulate tissue levels, antioxidant status and clinical course after major burns – preliminary results. *Clin Nutr.* 2002; 21 Suppl: 66.
174. Berger MM, Spertini F, Shenkin A, et al. Trace elements supplementation modulates pulmonary infections rates after major burns: a double blind, placebo controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68: 365-371.
175. Keaney JF, Frei B. Antioxidant protection of low density lipoprotein and its role in the prevention of atherosclerotic vascular disease. En: Frei E. *Natural antioxidants in human health and disease.* 1 ed. San Diego, CA: Academic Press. 1994. p. 303 - 351.
176. Pryor WA. Vitamin E and Heart Disease: Basic Science to intervention trials. *Free Rad Biol Med.* 2000; 28: 141-164.
177. García de Lorenzo y Mateos A. Scores pronósticos y Criterios diagnósticos en el paciente crítico. 2º ed, Madrid: Ergon; 2006.

178. Cerra FB. Nutrition in the critically ill: Modern metabolic support in the intensive care unit. En Chernow B. Crit Care State of the Art vol. 7. Fullerton, CA: Soc Crit Care Med; 1986. p. 1-17.
179. Espen. Guidelines on enteral nutrition. Clinical Nutrition. 2006; 2-7
180. Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadman ER, Shacter E: Determination of carbonyl groups in oxidised proteins. Methods Mol Biol 2000, 99: 15-24.
181. Jiang ZY, Woollard AC, Wolf SP: Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe 2+ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and idometric method. Lipids 1991, 26: 407-421.
182. Villaño D, Fernandez-Pachón S, Troncoso AM, García-Parrilla MC: Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolitos in vitro. Analytica Chimica Acta 2005, 538: 91-98.
183. Jacobsen D. Determinants of hyperhomocysteinemia : a matter of nature or nature. Am J Clin Nutr. 1996; 64: 641.
184. Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. Crit Rev Food Sci Nutr 1987; 25: 317-364.
185. Montejo JC. Enteral nutrition-related gastrointestinal complications in critically ill patients: a multicenter study. The Nutrition and Metabolic Working group of the Spanish Society of Intensive Care Medicine and Coronary Units. Crit Care Med. 1999; 27: 1447-1453.
186. McClave SA, Sexton LK, Spain DA, et al. Enteral tube feeding in the intensive care unit: factors impeding adequate delivery. Crit Care Med. 1999; 27: 1252-1256
187. Adam S, Baston S. A study of problems associated with the delivery of enteral feed in critically-ill patients in five ICUs in de UK. Intensive Care Medicine. 1997; 23: 261-266.
188. Eberner C, Kramhöller H, Eder E, et al. Enteral nutrition in critically ill surgical patients: do we meet caloric requirements in daily routine? Clinical Nutrition. 2001; 20: Suppl.3, 54.

189. Reid CL, Campbell IT. High energy deficits in MODS patients are associated with prolonged ICU length of stay but not mortality. *Clinical Nutrition*. 2001; 20, Suppl. 3, 52.
190. Plank LD, Hill GL. Energy balance in critical illness. *Proc Nutr Soc*. 2003; 62: 545-552.
191. Collen M, O'leary-Kelley RN, Kathleen A. Nutritional Adequacy.
192. Ritz MA, Fraser R, Tam W, et al. Impacts and patterns of disturbed gastrointestinal function in critically ill patients. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95:3044-3052.
193. Moore FA, Weisbrodt W. Gut dysfunction and intolerance to enteral nutrition in critically ill patients. Suiza: Nestle Nutrition Workshop Series Clinical and Performance Program; 2003. Vol.8.
194. Chapman MJ, Nguyen NQ, Fraser RJL. Gastrointestinal motility and prokinetics in the critically ill. *Curr Opin Crit Care*. 2007; 13:187-194.
195. Henseley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsean S, Floyd RA: Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2000, 28:1456-62.
196. Rice CA, Diplock AT, Symons MCR. Techniques in free radical research. Elsevier; 1991.
197. Argüelles S, García S, Maldonado M, Machado A, Ayala A: Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochimica et Biophysica Acta* 2004, 1674: 251-59.
198. Erel O: A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004, 37: 277-285.
199. Schindler K, Zauner C, Buchmayer H. High prevalence of hyperhomocysteinemia in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2000; 28 (4): 991-995.
200. Vanholder R, De Smet R. Pathophysiology effects of uremic retention solutes. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: 1815-1823.

201. Homocysteine Lowering Trialists's Colaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr.* 2005; (82): 806-812.
202. Rasmussen L, Oyesen L, Vulgo I, et al: Folate intake lifestyle factors and homocysteine concentrations in younger and older woman. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72: 1156-1163.
203. Clarke R, Refsum H, Briks J, Evans JG, et al: Screening for vitamin B-12 and folate deficiency in older persons. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:1241- 1247.
204. Aukrust P, Berge RK, Muller F, et al. Elevated plasma levels of reduced homocysteine in common variable immunodeficiency a marker of enhanced oxidative stress. *Eur J Clin Invest.*1997; 27: 723-730.
205. Voutilainen S, Morrow JD, Roberts LJ, et al. Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1269-1266.
206. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr Rev* 1994; 52: 253-265.
207. Pascual C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Oberhoffer M, et al: Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. *Crit Care Med.* 1998, 26: 705-709.
208. Gerardi GM, Usbert M, Martini G: Plasma total antioxidant capacity in hemodialysed patients and its relationships to other biomarkers of oxidative stress and lipid peroxidation. *Clin Chem Lab Med.* 2002, 40:104-110.
209. Harman D. Aging, a theory based on free radical radiation chemistry. 1956; 11: 298-300.