



Acidemia piroglutámica, glutación y estrés oxidativo como predictores en la evolución del paciente crítico con shock séptico

Yenifer Gamarra Morales
Departamento de Fisiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



PROGRAMA DE DOCTORADO NUTRICIÓN Y CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

TESIS DOCTORAL

**ACIDEMIA PIROGLUTÁMICA, GLUTATIÓN Y
ESTRÉS OXIDATIVO COMO PREDICTORES EN LA
EVOLUCIÓN DEL PACIENTE CRÍTICO CON
SHOCK SÉPTICO**



**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE FARMACIA
INSTITUTO DE NUTRICIÓN "JOSÉ MATAIX"
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

YENIFER GAMARRA MORALES

Granada, 2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Yenifer Gamarra Morales
ISBN: 978-84-1306-432-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/59536>



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
FACULTAD DE FARMACIA
INSTITUTO DE NUTRICIÓN "JOSÉ MATAIX"
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA



ACIDEMIA PIROGLUTÁMICA, GLUTATIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO COMO PREDICTORES EN LA EVOLUCIÓN DEL PACIENTE CRÍTICO CON *SHOCK* SÉPTICO

Memoria que presenta para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada la Licenciada D^a Yenifer Gamarra Morales.

DIRECTORES DE LA TESIS

Elena M^a Planells del Pozo

Doctora en Farmacia
Catedrática Fisiología
Universidad de Granada

Jorge Molina López

Doctor en Ciencias de la Actividad Física y el Deporte
Profesor Ayudante Doctor
Universidad de Huelva

Dr^a D^a Elena María Planells del Pozo, Catedrática de Fisiología de la Universidad de Granada,

y Dr D Jorge Molina López, Profesor Ayudante Doctor de Fisiología de la Universidad de Huelva,

**Directores de la Memoria de Tesis Doctoral Internacional de título:
*ACIDEMIA PIROGLUTÁMICA, GLUTATIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO COMO
PREDICTORES EN LA EVOLUCIÓN DEL PACIENTE CRÍTICO CON SHOCK
SÉPTICO***

**realizada por la Licenciada D^a Yenifer Gamarra Morales, autorizan su
presentación ante el Tribunal que en su día se designe.**

**Y para que así conste, y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman
la presente Tesis Doctoral a 5 de diciembre de 2019.**

Fdo. Elena M^a Planells del Pozo

Fdo. Jorge Molina López



El trabajo de investigación que constituye esta Tesis Doctoral titulada *ACIDEMIA PIROGLUTÁMICA, GLUTATIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO COMO PREDICTORES EN LA EVOLUCIÓN DEL PACIENTE CRÍTICO CON SHOCK SÉPTICO*, ha sido realizado gracias a la concesión de diferentes ayudas: Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (ref. PI10/01993), así como desde FIBAO mediante la ayuda recibida de la empresa Astellas Pharma, S.A. (UCI-FORMACION2-HUVN). Estos proyectos se han desarrollado en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix”, del Centro de Investigación Biomédica, y el Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, en colaboración con la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Virgen de las Nieves de Granada.

A mi madre, por enseñarme a luchar

A mi abuela, por enseñarme a amar

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, mostrar mi profundo agradecimiento a los pacientes y familia que han aceptado de manera altruista participar en nuestro estudio, y es seguro no será en vano.

Gracias a Elena Planells, mi directora y tutora de la presente tesis, por su constante apoyo y dedicación, y por hacer que siga ilusionada cada día con la investigación.

Gracias a Jorge Molina, mi codirector de la presente tesis, por todo lo que me ha enseñado, apoyado y animado, por enseñarme a ser cada vez mejor científica.

Gracias a José Antonio García y a Fernando Martínez por orientarme en los primeros momentos de mi elección del grupo de investigación.

Gracias a Felipe Carlos Santiago, intensivista del Hospital Virgen de las Nieves, por ayudarme en la inclusión de los pacientes en el estudio y en la recolección de datos clínicos.

Gracias a José Castaño, intensivista del Hospital Virgen de las Nieves, por ilustrarme con sus ideas y ayudarme en la selección de los pacientes.

Gracias a las enfermeras de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Virgen de las Nieves por ayudarme en la extracción de las muestras de los pacientes cualquier día y a cualquier hora.

Gracias a Juan N. Moliz y a Yolanda del “Centro de Instrumentación Científica de Granada” por ayudarme en algunas medidas de analitos del trabajo en el UPLC.

Gracias a Lourdes, Héctor y Lorenzo por ayudarme en el día a día en el laboratorio del “Instituto de Nutrición José Mataix” en el Centro de Investigación Biomédica de Granada.

Gracias a mis compañeros de residencia: Amada, Andrea, Carmen, Claudia, Juanmi, Lara, Lidia, María, Marina, Mari Luz, Mikel, Nieves, Pepe, Teresa y Vero, a los “Técnicos Superiores de Laboratorio” y a los “Facultativos Especialistas” del Hospital Universitario San Cecilio (nuevo hospital del Parque Tecnológico de la Salud) y del Hospital Virgen de las Nieves por aportar cada uno algo a mi formación.

Gracias al Dr. Pérez de la Cruz, Dr. De Haro Muñoz, Dr. Rodríguez Elvira, Dr. Garrido Torres-Puchol, por facilitarme realizar parte de la tesis doctoral en el Servicio de la UCI

del Hospital Virgen de las Nieves y en los dos laboratorios de Análisis Clínicos de los dos hospitales.

Gracias a Carlos Uceda por su colaboración en la edición de la tesis, por su paciencia y apoyo incondicional.

Gracias a mi familia y a mis amigos por hacerme más llevadero este periodo de investigación emocionante y a la vez absorbente.

“La gratitud es la llave que abre la puerta al poder de la sabiduría, de la creatividad y del universo” *Deepak Chopra*

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2,3-BPG: 2,3-Bifofoglicerato	G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos
ABC: Área Bajo la Curva	GGT: Gamma-glutamiltanspeptidasa
ADA: Adenosina desaminasa	Glu: Ácido glutámico
ADE: Amplitud de distribución eritrocitaria	GPx: Glutación peroxidasa
ADN: Ácido desoxirribonucleico	GPxs: Familia de Glutación peroxidadas
AGA: Sociedad Americana de Gastroenterología	GR: Glutación reductasa
APACHE II: del inglés Score Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II	GS: Glutación sintetasa
ARN: Ácido ribonucleico	GSSH: Glutación oxidado
ATP: Adenosina trifosfato	H ⁺ : Ión hidrógeno
CAT: Capacidad antioxidante total	H ₂ O ₂ : Peróxido de hidrógeno
CDO: Curva de disociación de oxígeno	Hb: Hemoglobina
c-GPx: Glutación Peroxidasa celular	HBV: Virus de la hepatitis B
CIBM: Centro de Investigación Biomédica	HCO ₃ : Bicarbonato
CLSI: del inglés Clinical and laboratory standards institute	HCT: Hematocrito
CO ₂ : Dióxido de carbono	HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
Cst: Complianza	HUPLC: Cromatografía líquida de ultra-alta resolución
Cu: Cobre	ICAM: Molécula de adhesión intracelular
DE: Desviación estándar	ICD: Clasificación Internacional de Enfermedades
DM II: Diabetes Mellitus tipo II	ICPMS: Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
Dop: Dopamina	IL-1: Interleucina 1
ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina	IMC: Índice de masa corporal
Epi: Adrenalina	IME: Índice Médico Español
ESICM: del inglés European Society of Intensive Care Medicine	INR: Ratio internacional normalizado
ESPEN: Sociedad Europea de Nutrición Clínica y Metabolismo	INYTA: Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos
FAD: Flavadenindinucleótido	IOT: Intubación orotraqueal
FiO ₂ : Fracción de oxígeno inspirada	IRA-IS: Insuficiencia respiratoria aguda hipoxémica inducida por sepsis
Fol: Ácido fólico	LC-MS: Cromatografía líquida-espectrometría de masas
GC: Gasto cardíaco	LDH: Lactato deshidrogenasa
	lpm: latido por minuto

MDA: Malonildialdehído	SDRA-IS: Síndrome de distrés respiratorio inducido por sepsis
MS: Espectroscopía de masas	Se: Selenio
NAC: N-acetil-l-cisteína	Sec: Selenocisteína
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	SEIMC: Asociación Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología
NF-κ –B: Factor nuclear kappa b	SEMES: Sociedad Española de Medicina de Urgencias y Emergencias
Nor: Noradrenalina	SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
NOx: Óxido nítrico	SRIS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
NT: Nitrotiroxina	SOFA: del inglés Sequential Organ Failure Assessment
O ⁻² : Anión superóxido	SPSS: del inglés Statistical Package for the Social Science
⁻ OH: Anión hidroxilo	SSC: Campaña de Supervivencia de la sepsis
OMS: Organización Mundial de la Salud	TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
OR: Odd ratio	TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa
PA: Presión arterial	TRAP: poder de captación de radicales totales
PABA: Ácido para-aminobenzoico	TTPA: Tiempo de tromboplastina parcial activada
PaCO ₂ : Presión parcial arterial de dióxido de carbono	UCI: Unidad de cuidados intensivos
PAM: Presión arterial media	URL: Unidades relativas de luz
PaO ₂ /FiO ₂ : Presión parcial de oxígeno arterial/Fracción de oxígeno inspirada	VCAM: Molécula de adhesión celular vascular
PCR: Proteína C reactiva	VCM: Velocidad corpuscular media
PCT: Procalcitonina	VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana
PEEP: Presión positiva al final de la espiración	Vit B12: Vitamina B12
PiroGlu: Ácido piroglutámico	Vit D: Vitamina D
PON 1: actividad de la paraoxonasa 1	VNI: Ventilación no invasiva
ppm: partes por millón	XO: Xantina oxidasa
PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados	
RMN: Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	
RNS: Especies reactivas de nitrógeno	
ROC: Característica Operativa del receptor	
ROS: Especies reactivas de oxígeno	
rpm: respiraciones por minuto	
SaO ₂ : Saturación de oxígeno	
SDMO: Síndrome de disfunción multiorgánica	

ÍNDICE

Índice

1. Introducción.....	29
1.1. Paciente crítico.....	29
1.1.1. Definición de paciente crítico y situación clínica.....	29
1.1.1.1. Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.....	30
1.1.1.2. Bacteriemia y fungemia.....	31
1.1.1.3. Escalas de gravedad.....	31
1.1.1.4. Sepsis.....	33
1.1.1.5. <i>Shock</i> séptico.....	36
1.1.1.6. Epidemiología de la sepsis y <i>shock</i> séptico.....	39
1.1.1.7. Protocolos de intervención en situación de sepsis.....	41
1.1.2. Estado nutricional del paciente crítico.....	46
1.1.2.1. Valoración nutricional.....	47
1.1.2.2. Desnutrición en el paciente crítico.....	49
1.1.2.3. Recomendaciones nutricionales en el paciente crítico.....	50
1.2. Estrés oxidativo en paciente crítico.....	64
1.2.1. Moléculas que intervienen en el estrés oxidativo.....	64
1.2.1.1. Prooxidantes.....	64
1.2.1.2. Antioxidantes.....	66
1.2.2. Equilibrio homeostático.....	67
1.2.3. Evidencia del estrés oxidativo en paciente crítico con sepsis.....	70
1.2.3.1. Fuentes de Especies Reactivas de Oxígeno en sepsis.....	70
1.2.3.2. Respuesta inmune en la sepsis.....	71
1.2.3.3. Daño celular en la sepsis.....	72
1.3. Glutación y ciclo gamma-glutamil.....	82
1.3.1. Glutación.....	82
1.3.1.1. Metabolismo del glutatión.....	82
1.3.1.2. Funciones del glutatión.....	86
1.3.2. Componentes del ciclo gamma-glutamil.....	88
1.3.2.1. Ácido piroglutámico o 5-oxoprolina.....	88
1.3.2.2. Glutamina.....	88
1.3.2.3. Ácido glutámico.....	90
1.3.3. Glutación peroxidasa.....	90
1.3.4. Ciclo gamma-glutamil en paciente crítico.....	92
2. Justificación, hipótesis y objetivos.....	97

2.1.	Justificación.	97
2.2.	Hipótesis.	98
2.3.	Objetivos	99
2.3.1.	Objetivos principales.	99
2.3.2.	Objetivos secundarios.	99
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.	103
3.1.	Búsqueda bibliográfica.	103
3.2.	Diseño del estudio.	103
3.3.	Sujetos del estudio.	104
3.3.1.	Datos registrados.	105
3.4.	Recolección de las muestras.	106
3.5.	Valoración de la gravedad del paciente.	108
3.6.	Métodos analíticos.	111
3.6.1.	Determinación de ácido piroglutámico y ácido glutámico.	111
3.6.2.	Determinación de la glutatión peroxidasa.	115
3.6.3.	Determinación de la capacidad antioxidante total.	118
3.6.4.	Determinación de selenio.	122
3.6.5.	Determinación de cobre.	122
3.6.6.	Determinación de vitamina B12, ácido fólico y vitamina D.	122
3.6.7.	Determinación de la interleuquina-6	125
3.6.8.	Otras magnitudes bioquímicas y hematológicas.	125
3.7.	Análisis estadístico.	126
4.	RESULTADOS.	129
4.1.	Estudio de las características de la muestra.	129
4.1.1.	Distribución de la muestra de los casos y los controles.	129
4.1.2.	Estudio de las características clínicas en el grupo de casos.	129
4.1.3.	Estudio de los parámetros bioquímicos en el grupo de casos.	132
4.2.	Estudio del ácido piroglutámico, ácido glutámico y glutatión peroxidasa.	135
4.2.1.	Prevalencia, comparación entre casos y controles y evolución de los niveles de ácido piroglutámico, ácido glutámico y glutatión peroxidasa.	135
4.2.2.	Estudio de asociación entre el ácido glutámico, ácido piroglutámico y glutatión peroxidasa.	137
4.2.3.	Asociaciones observadas entre niveles en orina y niveles en suero de ácido piroglutámico y de ácido glutámico.	139
4.2.4.	Asociación de los marcadores de gravedad clínicos con el ácido piroglutámico, ácido glutámico y glutatión peroxidasa.	140

4.2.5.	Asociación de los niveles de ácido piroglutámico, ácido glutámico y glutatión peroxidasa con la mortalidad.....	142
4.2.6.	Asociación de los niveles de ácido piroglutámico, ácido glutámico y glutatión peroxidasa con parámetros hematológicos, respiratorios y bioquímicos.....	142
4.2.7.	Curvas ROC según los niveles de ácido piroglutámico, ácido glutámico y glutatión peroxidasa.....	145
4.2.8.	Estudio de la capacidad antioxidante total.....	150
4.3.	Estatus del ácido fólico, la vitamina B12 y la vitamina D en el paciente crítico.....	154
4.3.1.	Comparación con controles y evolución de los niveles de ácido fólico, la vitamina B12 y la vitamina D durante la estancia en UCI.....	154
4.3.2.	Asociación entre el estatus de vitaminas (ácido fólico, la vitamina B12 y la vitamina D) e inflamación (IL-6) con los parámetros de gravedad y mortalidad.....	155
4.3.3.	Asociación entre el estatus de ácido fólico, vitamina B12 y vitamina D con los niveles de ácido piroglutámico, ácido glutámico y la actividad de la glutatión peroxidasa.....	157
4.3.4.	Comparación del estatus de ácido fólico, vitamina B12 y vitamina D con marcadores de fase aguda.....	158
4.3.5.	Curvas ROC según el estatus de ácido fólico, vitamina B12 y vitamina D.....	159
5.	DISCUSIÓN.....	165
5.1.	Evaluación de la metodología utilizada en el estudio.....	165
5.2.	Evaluación de las características clínicas y bioquímicas de los casos.....	165
5.3.	Evaluación de los resultados del estatus de ácido piroglutámico, de ácido glutámico y la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa.....	167
5.3.1.	Evaluación del ciclo gamma-glutamil: ácido piroglutámico y ácido glutámico.....	171
5.3.2.	Evaluación de los resultados de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa.....	174
5.3.3.	Evaluación de los resultados sobre los niveles de selenio.....	175
5.3.4.	Evaluación de la acidemia piroglutámica.....	177
5.3.5.	Evaluación de los resultados de la capacidad antioxidante total.....	178
5.3.6.	Evaluación de la necesidad de suplementación.....	180
5.4.	Evaluación de vitaminas y biomarcadores de morbimortalidad.....	182
5.4.1.	Alteración del ciclo de la homocisteína.....	182
5.4.2.	Evaluación de los resultados del estatus de la vitamina B12 y el ácido fólico.....	183
5.4.3.	Evaluación de los resultados de los niveles de vitamina D.....	186
5.4.4.	Evaluación de los resultados de inflamación.....	187
5.4.4.1.	Evaluación de los resultados de los niveles de interleucina-6.....	187

5.4.4.2. Evaluación de los resultados sobre los niveles de ácido láctico y de procalcitonina.	189
5.5. Resumen de los resultados más importantes.	189
5.6. Limitaciones del estudio.....	190
6. Conclusiones.	195
7. Referencias bibliográficas.....	199
8. Publicación de calidad.	243
8.1. Indicios de calidad de la publicación.....	267

INTRODUCCIÓN

1. Introducción.

1.1. Paciente crítico.

1.1.1. Definición de paciente crítico y situación clínica.

El paciente crítico es el portador de un proceso potencialmente reversible que pone en peligro su vida, no pudiendo mantener un equilibrio homeostático sin intervención. Estos pacientes, por lo general, manifiestan signos y síntomas que en su conjunto expresan una respuesta aguda del organismo ante la agresión, que se ve traducida en el denominado síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), y que a su vez deriva en el síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO), que en muchos casos tiene un desenlace mortal. Se puede definir al paciente crítico por cuatro aspectos fundamentales:

- Presentar un proceso de enfermedad grave potencialmente reversible.
- Presentar una inflamación.
- Disfunción orgánica.
- Elevada mortalidad.

En función de las características del paciente y el tipo de agresión sufrida, el paciente crítico puede presentar una de las siguientes afecciones: traumatismo, infección, cirugía mayor, lesión o enfermedad neurológica o una hemorragia mayor. En el paciente crítico se produce una respuesta metabólica que se puede dividir en dos fases:

- a) Fase inicial: Cursa con una hipovolemia, hipotensión e hipoxia tisular que aparece en las primeras 24 horas.
- b) Fase tardía: Se produce una alta secreción de catecolaminas y de mediadores inflamatorios, sobretodo citoquinas e eicosanoides. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1 (IL-1) contribuyen a aumentar el gasto energético, la degradación proteica y el aumento de la glucogenolisis, así como la activación de la lipoproteinlipasa. Por lo tanto, en esta fase predomina el catabolismo.

Tras estas fases, se produce una fase más prolongada que desencadenan en el paciente crítico un estado de inmunodepresión fundamentalmente debido a las siguientes causas:

- Exceso en la producción de citoquinas.
- Liberación de metabolitos del ácido araquidónico.
- Desnutrición aguda como respuesta metabólica a la agresión.
- Déficit de nutrientes específicos.
- Alteración de la flora intestinal.
- Exceso de producción de radicales libres (aniones superóxido, hidroxilos, y peróxidos), con daño tisular asociado.

1.1.1.1. Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.

El SRIS se traduce como un conjunto de fenómenos clínicos y fisiológicos que resultan de la activación general del sistema inmune. Se caracteriza por ser una reacción proinflamatoria anormal y generalizada que se presenta a nivel orgánico lejos de donde se genera la agresión inicial. La evolución del paciente va a depender del balance entre SRIS y los mecanismos compensatorios de la respuesta inflamatoria, pudiendo desencadenar un SDMO, o incluso la muerte. Algunos mecanismos compensatorios se producen inmediatamente, como la respuesta antiinflamatoria, pero otros dependen de los aportes de algunos sustratos y/o medidas terapéuticas. En la **Tabla 1** se indican los criterios que debe cumplir un paciente para diagnosticar un SRIS (1).

Tabla 1. Definición objetiva del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.

Variables	Criterios
Temperatura	> 38° ó < 36°C
Frecuencia cardíaca	> 90 lpm
Frecuencia respiratoria	> 20 rpm ó PaCO ₂ < 32 mmHg
Recuento de leucocitos	> 12000mm ³ ó < 4000mm ³

lpm: latidos por minuto. SRIS = Se deben cumplir al menos 2 de los 4 parámetros.

Cuando el agresor entra en contacto con el organismo se produce la fase I o fase aguda que dura unos 2 o 3 días. Si la evolución del paciente es favorable, se concluye el proceso con la fase II o fase de reparación, pero si la evolución no es favorable, se produce la fase III o fase de reactivación. En esta última fase se activan los macrófagos y monocitos liberando mediadores proinflamatorios que determinan el estado de

inflamación sistémica generalizado. Si el proceso sigue evolucionando de forma negativa, se llega a la fase IV (fase de fallo multiorgánico o disfunción multiorgánica) que es la fase que puede concluir con la muerte.

1.1.1.2. Bacteriemia y fungemia.

Una infección se define como el proceso por el cual ingresan gérmenes a una zona susceptible del organismo y se multiplican, provocando la enfermedad. En este sentido, la “Asociación Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica” (SEIMC) define la bacteriemia y la fungemia como “la presencia de bacterias en la sangre que se pone de manifiesto por el aislamiento de éstas en los hemocultivos” (2). El origen de la bacteriemia puede ser diverso atendiendo a las características clínicas del paciente. El término fungemia se utiliza para designar la presencia de hongos en la sangre, generalmente levaduras del género *Candidas spp.* que, aunque pueden originarse a partir de focos semejantes a los que ocasionan las bacteriemias, frecuentemente tienen su origen en la infección de catéteres.

En condiciones de respuesta inflamatoria exagerada o no compensada, puede desarrollarse el SRIS junto a procesos de infección y septicemia. Un paciente que presenta SRIS y septicemia, por lo general presenta un estado hipercatabólico en el que se produce un aumento del gasto energético total, una mayor degradación proteica y pérdida de peso. En este estado, se producen alteraciones en el sistema inmunitario con hiperactivación o inmunosupresión que pueden agravar aún más el problema de septicemia. También se van a liberar mediadores endógenos proinflamatorios como citocinas, monocitos, factor tisular, células endoteliales, hormonas, moléculas de adhesión, que pueden dar lugar a una disfunción multiorgánica y contribuir a una mayor mortalidad (3).

1.1.1.3. Escalas de gravedad.

Síndrome de Disfunción Multiorgánica

El SDMO se caracteriza por un fallo funcional de dos o más órganos funcionales en un paciente con un proceso de enfermedad aguda en el que la homeostasis no puede

ser mantenida sin intervención (4). Este síndrome se puede clasificar como primario o secundario.

- SDMO primario: Se produce cuando una injuria está bien definida y la disfunción orgánica se puede atribuir directamente a ella. La disfunción orgánica ocurre de forma precoz.
- SDMO secundario: En este caso la disfunción orgánica no se puede atribuir directamente a la injuria, pero si a la respuesta del organismo a dicha injuria.

En la actualidad, el SDMO es la causa de morbimortalidad más frecuente en el paciente crítico. Se solía relacionar con cuadros de sepsis incontrolada, pero hoy en día se acepta que hay otras causas que pueden provocar un SDMO sin necesidad de existir un cuadro infeccioso. Debido a las mejoras terapéuticas se ha producido un descenso en la incidencia y severidad de este síndrome. Para que esto continúe es fundamental poder hacer un diagnóstico y un seguimiento de su evolución en el tiempo.

Sequential Organ Failure Assessment

En la conferencia de consenso realizada en Paris, en 1994, organizado por la *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM), se creó la escala *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA), considerada como marcador de morbilidad con una finalidad descriptiva y fácil de calcular. El SOFA individualiza el grado de disfunción orgánica obtenida periódicamente, a partir del estudio de seis órganos. Se trata de una escala que pretende objetivar la presencia del SDMO, siendo uno de los scores más utilizados (5). Independientemente de la puntuación inicial, un aumento en la puntuación SOFA durante las primeras 48 horas en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) es capaz de predecir una tasa de mortalidad de al menos el 50%. Por tanto, el SOFA se puede considerar como un buen indicador pronóstico durante los primeros días de ingreso en la UCI (6).

Score Acute Physiology and Chronic Health Evaluation

El *Score Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II* (APACHE II), es un sistema de valoración pronóstica de mortalidad con el que se pueden detectar los

trastornos fisiológicos agudos que atentan contra la vida del paciente. La puntuación resultante es un factor predictivo de la mortalidad. La utilización de los dos sistemas de puntaje de gravedad SOFA más APACHE II, siempre va a tener más rendimiento diagnóstico que la utilización de cualquier escala por separado (7). El cálculo de APACHE II proporciona una información relativa al paciente en el momento de la determinación. Este cálculo varía cada día de estancia en la UCI, que puede variar incluso en horas.

1.1.1.4. Sepsis.

Las definiciones de sepsis y *shock* séptico se plantearon en una reunión de consenso en el año 1992 (Sepsis-1) (4). Se revisaron en 2001 (Sepsis-2), quedando definidas en 2003 como la presencia de SRIS causado por una infección (8). En años posteriores hubo muchos cambios en la patobiología, manejo y epidemiología de la sepsis, y concretamente en 2016, se volvió a definir la sepsis (Sepsis-3) como “una disfunción orgánica donde la vida del paciente está comprometida causado por una respuesta alterada del huésped frente a una infección” (9). En el Tercer Consenso Internacional de la Definición de Sepsis y Shock Séptico, la sepsis se define exactamente como “disfunción orgánica que pone en peligro la vida causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección con una mortalidad intrahospitalaria mayor del 10%” (9). También es aceptada la definición de sepsis como: una afección potencialmente mortal que surge cuando la respuesta del cuerpo a la infección daña sus propios tejidos (9,10). La definición de sepsis-3 parece diagnosticar a menos pacientes de sepsis y está más fuertemente asociada a resultados adversos o gravedad del paciente que la sepsis-2 (11).

En un estudio longitudinal realizado entre 2007 y 2016, se incluyeron 722 pacientes con lesiones graves de los cuales 315 pacientes cumplieron con los criterios de sepsis-2 y 148 cumplieron con los criterios de sepsis-3 durante los primeros diez días en la UCI. La *odd ratio*(OR) para la mortalidad a 30 días fueron 0.7 (IC 0.4-1.2) para sepsis-2 y 1.5 (IC 0.8-2.6) para sepsis-3. Al censurar a los pacientes que morían en el día 1, la sepsis-3 se asoció con la mortalidad a los 30 días, mientras que la sepsis-2 no. Este hallazgo fue persistente y mejoró a través de la continua censura diaria de muertes tempranas. Se observó el mismo patrón para los análisis de la curva de Característica

Operativa del Receptor (ROC), la censura de muertes tempranas resultó en propiedades discriminatorias significativas para la sepsis-3 pero no para la sepsis-2 (11). Ha quedado demostrado que la definición de sepsis-3 mejora la estratificación del riesgo en pacientes con sospecha de infección y su validez predictiva para detectar resultados clínicos desfavorables (6,12–19).

El concepto de sepsis como infección con al menos 2 de los 4 criterios de SRIS, estaba únicamente centrado en el exceso inflamatorio, por eso ha sido tan cuestionada la validez del SRIS como único descriptor de la patología de sepsis. En la sepsis además de producirse una respuesta proinflamatoria, se produce una respuesta antiinflamatoria (20).

En situación de sepsis, la respuesta que manifiesta el huésped a un patógeno infeccioso se puede ver intensificada por factores endógenos (21,22). En la sepsis endotóxica, el grado de exposición del factor tisular alcanza niveles patológicos; lo que provoca en estos pacientes un estado de hipercoagulabilidad o los predispone a experimentar problemas de sangrado, según la patología altere los niveles de trombina. En la sepsis se producen cambios importantes en vías no inmunológicas como la cardiovascular, autónoma, hormonal, neuronal, bioenergética, metabólica y de coagulación (21,23,24). Sin embargo, se ha visto que la disfunción de los órganos, incluso cuando es muy grave, no está asociada con una muerte celular importante (25).

Es importante establecer una definición de diagnóstico de sepsis y *shock* séptico para poder hacer una investigación y evaluación comparativa entre diferentes centros hospitalarios. Los datos clínicos aportados pueden estar condicionados por los distintos enfoques de codificación que siga cada uno. Por lo tanto, las comparaciones epidemiológicas entre las diferentes cohortes son difíciles de establecer (26,27). En relación con esto, la definición de sepsis-3 se estableció también para aumentar la uniformidad en las tasas de incidencia y la mortalidad registradas (9,28,29).

A pesar de lo anteriormente mencionado, la definición de sepsis-3, puede que no sea la definitiva y necesite mejorar, porque carece de robustez y de capacidad discriminatoria, ya que casi todos los pacientes que entran en la UCI con sospecha de infección cumplen esos criterios (30,31). Los esfuerzos futuros deben ir encaminados a enriquecer la estratificación de los pacientes sépticos y clasificarlos incluyendo

variables adicionales, como el tipo de insuficiencia orgánica, el número de disfunciones orgánicas, el origen de la infección y los posibles biomarcadores (32).

SRIS en la sepsis

Los criterios para diagnosticar un SRIS son bastante inespecíficos. Nos podemos encontrar la apirexia o la neutrofilia, que nos van a seguir ayudando a identificar una infección. Es importante también identificar la fuente anatómica y el organismo infectante. En este sentido nos pueden guiar hallazgos como la disuria, la peritonitis, la erupción cutánea, la consolidación pulmonar, etc. La sepsis no solo engloba una infección y una respuesta inflamatoria del hospedador sino también implica una disfunción orgánica. Los criterios para diagnosticar un SRIS tampoco son sensibles, no indican una respuesta del huésped desregulada o potencialmente mortal (33,34). Además, la definición de sepsis que se basó en los criterios de SRIS (sepsis-2) fueron muy sensibles a pequeñas variaciones en la frecuencia y el tiempo, lo que afectó la fiabilidad del diagnóstico de sepsis (33).

SOFA en la sepsis

La puntuación de SOFA se ve aumentada en más de 2 puntos como consecuencia de la infección. Se supone que la puntuación basal de SOFA es 0 en pacientes que no se tiene identificada la disfunción orgánica previamente. Tener más de 2 puntos de SOFA implica tener un riesgo de un 10% de mortalidad para pacientes hospitalizados con sospecha de infección. La puntuación de SOFA no se utiliza para manejo del paciente sino más bien para caracterizar clínicamente a un paciente séptico, por eso, se recomienda utilizar esta escala en pacientes con sepsis (9). En la definición de sepsis-3 se eliminó el criterio de SRIS y se definió clínicamente como un aumento en la puntuación SOFA dos puntos o más junto con la presencia de infección (9,28).

Son muchos los hallazgos que podemos encontrarnos en las medidas de cabecera y en las pruebas de laboratorio rutinarias que determinan la existencia de una inflamación o disfunción de órganos (35). Para determinar el SOFA es necesario algún parámetro de laboratorio como la creatinina o bilirrubina, lo que provoca que no se

pueda dar la puntuación final de forma inmediata. También se han estudiado otros biomarcadores para identificar el daño hepático, renal o la coagulopatía, pero aún no están validados y por ello no han sido incluidos en los criterios clínicos de diagnóstico de sepsis (9,36).

1.1.1.5. *Shock séptico.*

El *shock* séptico se define como “un subconjunto de sepsis en el cuál las anomalías subyacentes en el metabolismo circulatorio y celular son lo suficientemente profundas como para aumentar sustancialmente la mortalidad” (9). Los pacientes que la manifiestan, desarrollan hipotensión persistente que requiere vasopresores para mantener una presión arterial media (PAM) ≥ 65 mmHg y tener un nivel sérico de lactato > 2 mmol/L (18 mg/dL) a pesar de la reanimación de volumen adecuado (29). Con estos criterios, la mortalidad hospitalaria es superior al 40% (9).

Aunque hay controversia, la gran mayoría de los expertos afirman niveles elevados de lactato reflejan una disfunción celular en la sepsis. También reconocen que hay otros factores que influyen como el suministro insuficiente de oxígeno en el tejido, la alteración de la respiración aeróbica, la aceleración de la glucólisis aeróbica y la reducción del aclaramiento hepático (9,37). La hiperlactacidemia es un marcador de la gravedad de la enfermedad y un buen predictor de la mortalidad (38).

En pacientes sépticos es necesaria una resucitación adecuada con vasopresores. Esta terapia varía mucho en función de las características del paciente, la modalidad adoptada de monitorización y los objetivos hemodinámicos que se marquen (39).

En cuanto a la mortalidad, se ha visto que los pacientes con criterios de sepsis que tienen hipotensión y son resistentes a vasopresores, y que tienen lactato elevado, tienen mayor riesgo de mortalidad que los que tienen hipotensión y lactato elevado solamente. Estos últimos, a su vez, presentarían más riesgo que los que tienen hipotensión y lactato de 2 mmol/L o menos (9).

De acuerdo con la importancia de aplicar con precisión los códigos de diagnóstico, la **Tabla 2** detalla cómo los nuevos criterios clínicos de sepsis y *shock* séptico se correlacionan con los códigos ICD-9-CM e ICD-10 (9).

Tabla 2. Terminología y Clasificación Internacional de Enfermedades.

Pautas actuales y terminología	Sepsis	Shock séptico
1991 y 2001 Terminología del consenso	Sepsis severa Sepsis inducida Hipoperfusión	<i>Shock séptico</i>
2015 Definición	La sepsis es una disfunción orgánica que pone en peligro la vida, causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección.	El <i>shock séptico</i> es un subconjunto de sepsis donde las alteraciones circulatorias, metabólicas y celulares subyacentes son lo suficientemente profundas como para aumentar sustancialmente la mortalidad.
2015 Criterios clínicos	Sospecha de infección o infección identificada más un aumento agudo de 2 puntos o más en el SOFA.	La sepsis ^a y la terapia con vasopresores se necesitan para elevar la PAM ≥ 65 mmHg y el lactato > 2 mmol/L (18 mg/dL) a pesar de una resucitación fluida adecuada.
Códigos primarios ICD recomendados^a		
ICD-9	995.92	785.52
ICD-10^a	R65.20	R65.21
Marco de implementación para codificación e investigación.	Identificar la infección sospechosa mediante el uso de hemocultivos concomitantes y antibióticos (orales o parenterales) en un período específico ^b .	
	Dentro del período especificado en la infección sospechosa: 1. Identificar la sepsis mediante el uso de un criterio clínico de disfunción orgánica que ponga en peligro la vida. 2. Evaluar los criterios de shock, utilizando administración de vasopresores, PAM < 65 mmHg y lactato > 2 mmol/L (18 mg/dL) ^d	

ICD: Clasificación Internacional de Enfermedades. PAM: Presión Arterial Media. SOFA: Evaluación secuencial del fallo orgánico. ^aCódigos de entrenamiento incluidos. ^bLa sospecha de infección podría definirse como la administración concomitante de antibióticos orales o parenterales y el muestreo de cultivos de fluidos corporales (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, peritoneal, etc.). Por ejemplo, si se obtiene el cultivo, se requiere que el antibiótico se administre dentro de las 72 horas, mientras que si el antibiótico es el primero, el cultivo se requiere dentro de las 24 horas. ^cSe considera un período de hasta 48 horas antes y hasta 24 horas después del inicio de la infección, aunque los análisis de sensibilidad han probado ventanas tan cortas como 3 horas antes y 3 horas después del inicio de la infección. ^dCon el período especificado en torno a la infección que se sospecha, se evalúan los criterios de shock, utilizando cualquier iniciación vasopresora (p. Ej., Dopamina, norepinefrina, epinefrina, vasopresina, fenilefrina), cualquier nivel de lactato > 2 mmol/L (18 mg/dL) y presión arterial media < 65 mmHg. Estos criterios requieren una reanimación con fluidos adecuada según lo definido por las pautas de la Campaña Sobrevivir a la Sepsis. *Procede del "Tercer Consenso Internacional de Definición de Sepsis y Shock Séptico" (Singer, 2016).*

En la **Tabla 3** se detallan los criterios diagnósticos de SRIS, de sepsis y de *shock* séptico (40–42).

Tabla 3. Criterios diagnósticos SRIS, de sepsis y de *shock* séptico.

SRIS: presencia de dos o más de entre los siguientes.	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura corporal > 38°C o < 36°C. - Frecuencia cardíaca > 90 latidos por minuto. - Frecuencia respiratoria > 20 por minuto o PaCO₂ < 32 mmHg. - Recuento de leucocitos > 12000 por mm³ o < 4000 por mm³ o > 10% de formas inmaduras.
Sepsis: infección documentada o sospechada y alguno de entre los siguientes.	<p><u>Generales:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Temperatura corporal > 38°C o < 36°C. - Hipotermia (< 36 °C). - Frecuencia cardíaca > 90 latidos por minuto. - Frecuencia respiratoria > 20 por minuto o PaCO₂ < 32 mmHg. - Edemas o balance de fluidos positivo (> 20mL/kg en 24 horas). - Hiperglicemia (glucosa en plasma > 140 mg/dL o 7.7 mmol/L) en ausencia de diabetes mellitus. <p><u>Variables inflamatorias:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Recuento de leucocitos > 12000 por mm³ o < 4000 por mm³ o > 10 % de formas inmaduras. - Proteína C reactiva mayor de dos veces su valor normal. - Procalcitonina mayor de dos veces su valor normal.
Sepsis grave.	<p><u>Variable hemodinámicas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Hipotensión arterial (PAS < 90 mmHg, presión arterial media < 70 mmHg o descenso en la PAS superiores a 40 mmHg) <p><u>Variables de disfunción de órganos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Hipoxemia arterial (PaO₂/FiO₂ < 300). <ul style="list-style-type: none"> • Daño pulmonar agudo con PaO₂/FiO₂ < 250 en ausencia de neumonía como foco de infección. • Daño pulmonar agudo con PaO₂/FiO₂ < 200 en presencia de neumonía como foco de infección. - Oliguria aguda (diuresis < 0.5 mL/kg/h durante al menos 2 h pese a reanimación con fluidos). - Creatinina > 2 mg/dL (176.8 μmol/L) o incrementos de creatinina > 0.5 mg/dL o 44.2 μmol/L. - Trastornos en la coagulación (INR > 1,5 o TTPa > 60 s). - Íleo (ausencia de sonidos intestinales). - Trombocitopenia (recuento de plaquetas < 100000/μL). - Hiperbilirrubinemia (bilirrubina tota plasmática > 4 mg/dL o 70 μmol/L). - Bilirrubina > 2 mg/dL (34.2 μmol/L). - Criterios de encefalopatía séptica: confusión, obnubilación, coma. <p><u>Variables de perfusión tisular:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Hiperlactacidemia (> 1 mmol/L). - Aumento en el tiempo de relleno capilar.
<i>Shock</i> séptico.	Cuadro de sepsis grave con hipotensión arterial que no responde a fluidoterapia adecuada y que requiere drogas vasopresoras.
<i>Shock</i> séptico refractario.	<i>Shock</i> séptico de más de una hora de evolución que no responde a la infusión de líquidos y/o fármacos.

SRIS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. PAS: Presión arterial sistólica. PaO₂/FiO₂: Presión parcial de oxígeno arterial / Fracción de oxígeno inspirada. PaCO₂: Presión parcial arterial de dióxido de carbono. INR: Ratio Internacional Normalizado. TTPA: Tiempo de tromboplastina parcial activada. *Adaptación de "Campana para sobrevivir a la sepsis (Rhodes, 2016).*

1.1.1.6. Epidemiología de la sepsis y *shock* séptico.

La sepsis puede augurar la muerte, especialmente si no se reconoce temprano y se trata con prontitud. De hecho, a pesar de los avances que incluyen vacunas, antibióticos y cuidados agudos, la sepsis sigue siendo la principal causa de muerte por infección. Es una enfermedad con una alta morbilidad para la cual no existe un tratamiento efectivo. Los pacientes con sepsis suelen generar un consumo de recursos muy elevado en la UCI, así como un alto costo porque generalmente requieren muchos equipos de soporte, un equipo humano continuo y empleo costoso de antibióticos. Diversos estudios informan que el coste de cada episodio de sepsis puede rondar los 40000 euros y un episodio de *shock* séptico los 45000 euros (43,44).

Existe una morbilidad séptica asociada a los tratamientos quirúrgicos y médicos avanzados, y ésta es inaceptablemente alta. Solo teniendo en cuenta los EEUU con una población de 300 millones de habitantes, la sepsis anualmente afectará a casi un millón de habitantes y causará la muerte de 200000 pacientes, lo que convierte a la sepsis en la décima causa más común de muerte en los EEUU. Esta situación se ve influida por dos factores, el primero sería el aumento de la debilidad causada por el estilo de vida que deteriora el sistema inmunitario, y el segundo sería el ambiente artificial creado por los tratamientos modernos como la ventilación mecánica, el uso de tubos, líneas intravasculares, drenajes, nutrición artificial y el uso extendido de drogas químicas, sintéticas, así como métodos que reducen o eliminan la microbiota humana y dañan el sistema inmunitario provocando el aumento de la inflamación sistémica. Los intentos por recuperar la microbiota intestinal con el aporte de microorganismos a veces mostraron resultados positivos y otras veces fallaron, sobre todo por hacer una elección inadecuada de la especie microbiota o por administrar una dosis baja. La administración de probióticos no se ha probado como terapia alternativa, solo se ha administrado como terapia complementaria al resto de tratamientos (45).

En general, en el 2% de las personas que ingresan en el hospital cursan con sepsis, y en la UCI, la sepsis puede ocurrir entre el 6 y el 30% de los pacientes cuya variabilidad es debida a la existencia de distintos tipos de UCI (46). La carga mundial de la sepsis se estima entre 15 y 19 millones de casos por año, con una tasa de mortalidad cercana al 60% en los países de bajos ingresos. En países desarrollados, se estima una incidencia de sepsis grave de entre 50 y 100 casos/100000 habitantes al año (47). La sepsis severa está presente entre la mitad y las tres cuartas partes de los pacientes en estado crítico (48). El *shock* séptico es la principal causa de muerte en la UCI, y a pesar de un mayor conocimiento sobre la patogénesis de la sepsis, su tasa de mortalidad sigue siendo alta, aproximadamente del 20-80% (41,49).

En España, la incidencia anual de sepsis entre los años 2008-2012 aumentó desde 76.5 a 113.3 casos/100000 habitantes al año, periodo en el que se diagnosticaron 217280 nuevos casos de sepsis. Sin embargo la mortalidad intrahospitalaria disminuyó desde 46.1% al 39.5% (50). Actualmente, la incidencia se sitúa en 97 casos/1000000 habitantes al año en nuestro país.

Se producen en España 175000 casos de sepsis al año, 50000 de ellos graves. Según la Sociedad Española de Medicina de Urgencias y Emergencias (SEMES), en España mueren 17000 personas al año de sepsis. Hay que valorar que en 2018, murieron 423636 personas en total en España, 887 personas menos que en 2017. La incidencia de sepsis está aumentando debido al envejecimiento poblacional, a la mayor supervivencia de los pacientes con cáncer y al aumento de la población con acúmulo de comorbilidades procedentes de personas sometidas a tratamientos inmunosupresores o terapias biológicas. Se considera una enfermedad tiempo-dependiente, que por cada hora de retraso en la instauración del tratamiento aumenta en un 8% la mortalidad del paciente. Se estima que en España, un episodio de sepsis tiene un coste de entre 10000 y 18000 euros.

Se hizo un estudio para establecer la asociación del rendimiento de los paquetes de la Campaña de Supervivencia de la Sepsis (SSC) (cuyas pautas se establecieron en 2004) y la mortalidad. La población de estudio fueron 29470 entre 2005 y 2012. Se observó que en los sitios donde se llevaba a cabo un alto cumplimiento de estos paquetes de reanimación había una menor mortalidad (29.0%) que aquellos donde se llevaba a cabo un bajo cumplimiento de los paquetes de reanimación cuya mortalidad

era más alta (38.6%). La tasa de mortalidad hospitalaria, la estancia hospitalaria y la estancia en UCI disminuyeron a medida que aumentó el cumplimiento con el paquete de reanimación (51).

Existen varios factores de riesgo específicos que aumentan la probabilidad de padecer sepsis. Aquellas condiciones que pueden afectar al sistema inmunitario del individuo, como por ejemplo virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), cáncer o diabetes, hacen más probable la aparición de sepsis en estos individuos (52).

La diabetes mellitus tipo II (DM II) se considera un factor de riesgo para padecer sepsis. Se ha determinado que en España, el 23.3% de los casos de sepsis se producen en personas con DM II. Además, el aumento de la incidencia de sepsis entre los años 2008-2012 ha sido mayor en los pacientes con DM II que en el resto de la población, que fue de 16.8 a 27.1 casos/100000 habitantes al año (61.3 % de incremento relativo). Sin embargo, el riesgo de muerte en estos pacientes es menor que en el resto de la población, aunque en pacientes con DM II con *shock* séptico la mortalidad fue más alta (50).

Otro estudio realizado en España en el periodo 2006-2011, observó que había disfunción orgánica en el 54% de los casos de sepsis grave, de los cuales el 26% y el 20%, presentaban dos o tres, o más disfunciones orgánicas respectivamente. La mortalidad hospitalaria fue del 43% y se asoció con pacientes de mayor edad, con la comorbilidad, con mayor disfunción de órganos, y con aquellos casos de patógenos gramnegativos (53). También se han visto otros factores que influyen en la aparición de la sepsis como es el género, la raza y la etnia. En general, independientemente de la edad, los hombres tienen mayor probabilidad de padecer sepsis que las mujeres (54,55). En cuanto a la raza y la etnia, no son claras las diferencias, pero parece que las razas no caucásicas tienen mayor riesgo de desarrollar sepsis que las razas caucásicas (55–57).

1.1.1.7. Protocolos de intervención en situación de sepsis.

A parte de la clínica que manifiesta el paciente y de los biomarcadores, es importante utilizar técnicas de imagen para detectar el foco de infección y a qué órganos está afectando. También son importantes las técnicas microbiológicas para detectar el

agente causal de la infección con la finalidad de que el tratamiento sea más específico. A continuación se exponen las medidas de estabilización de estos pacientes:

Fluidoterapia

Para tratar la grave hipoperfusión que se manifiesta en estos pacientes con un lactato plasmático ≥ 4 mmol/L o hipotensión arterial, se aconseja utilizar cristaloides (suero salino 0.9% o ringer lactato) o coloides con una dosis de carga inicial. Si continúa el estado inicial, la administración de fluidos continuará hasta alcanzar los siguientes objetivos (58):

- Mantener una PAS > 90 mmHg o una PAM > 65 mmHg.
- Mantener una diuresis > 0.5 mL/kg/h.
- Alcanzar una Presión Venosa Central (PVC) > 8 mmHg.
- No se ha demostrado beneficio en mantener una saturación venosa central de oxígeno (SvcO₂) $> 70\%$ o alcanzar un aclaramiento de lactato $> 10\%$ cada 2 horas, utilizando una resucitación con fluidoterapia y vasopresores no protocolizada basada en la buena práctica clínica.

En pacientes con sepsis grave o *shock* séptico se podría utilizar albúmina en la resucitación (59) (individualizando cada caso) y no se recomienda utilizar hidroxietilalmidones (60).

Vasopresores e inotropos

La utilización de esta terapia tiene como objetivo alcanzar una PAM de 65-70 mmHg (41,61). Como fármaco vasopresor de primera elección se recomienda utilizar la noradrenalina (40,62), y cuando ésta es insuficiente se recomienda asociar con adrenalina (63) o con vasopresina (con la intención también de disminuir la dosis de noradrenalina) (64). Cuando la noradrenalina causa arritmias graves, el gasto cardíaco (GC) es alto, la presión arterial (PA) es baja o la combinación vasopresor/inotropo no logran el objetivo de la PAM, se recomienda utilizar la fenilefrina como alternativa a la noradrenalina (65,66). Cuando hay un bajo GC o una hipoperfusión a pesar de una adecuada volemia y unas cifras normales de PA, se recomienda asociar dobutamina (58,67).

Esteroides

En caso de que el paciente continúe en *shock* después de la terapia vasopresora, es decir, el PAM ≤ 65 mmHg o el lactato ≥ 4 mmol/L, se recomienda el uso de esteroides a dosis bajas (68,69). El esteroide de elección es la hidrocortisona a dosis bajas (≤ 300 mg/día) (70–73), sin ser necesario el empleo de un mineralo-corticoide asociado como la fludrocortisona (74).

Soporte respiratorio

Se debe hacer un aporte suplementario de oxígeno para mantener una saturación de oxígeno (SaO₂) que se mantenga o sea superior al 93% (41,58). La ventilación no invasiva (VNI) se puede utilizar en pacientes con síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis (SDRA-IS) cuando la relación beneficio/riesgo sea favorable (41,75–77). La VNI en la fase inicial del proceso, es útil en pacientes con insuficiencia respiratoria aguda hipoxémica inducida por sepsis (IRA-IS) que además están inmunosuprimidos para evitar la intubación orotraqueal (IOT) y reducir sus complicaciones (78,79). También es útil la VNI en pacientes con IRA-IS que no son candidatos a la IOT por su edad o patología preexistente (80,81).

Soporte renal

Los diuréticos están indicados en los pacientes con sepsis grave o *shock* séptico solo en los casos que se presente fallo renal agudo (41,82).

Soporte metabólico-nutricional

El manejo metabólico nutricional constituye uno de los pilares del tratamiento del paciente séptico. El soporte nutricional es fundamental para evitar las consecuencias de la desnutrición, proveer al paciente un adecuado aporte de nutrientes y prevenir el desarrollo de complicaciones secundarias como la sobreinfección y el fracaso

multiorgánico. Se recomienda no comenzar con el soporte nutricional hasta que el paciente se encuentre en situación estable (83).

Cuando la vía enteral es insuficiente para garantizar las necesidades calórico-proteicas, la administración mixta junto a nutrición parenteral ha demostrado ser segura en este subgrupo de pacientes (83). La nutrición enteral se recomienda en lugar de la vía parenteral cuando el tracto gastrointestinal se mantiene íntegro (84–86). En pacientes con sepsis grave o shock séptico se debe establecer un protocolo para manejar de forma adecuada las glucemias que debe contener las siguientes consideraciones (40):

- Ser de aplicación a pacientes ingresados en la UCI.
- Estar basado en la administración de infusiones de insulina intravenosa.
- Comenzar cuando dos determinaciones consecutivas tengan valores superiores a 180 mg/dL.
- Tener como objetivo que las determinaciones de glucemia no alcancen los límites de 180 mg/dL (87,88).

El paciente séptico debe recibir un adecuado aporte de oligoelementos y vitaminas. Los estudios que evalúan el efecto de farmaconutrientes específicos en estos pacientes son escasos y no permiten establecer recomendaciones al respecto (83).

Existe evidencia suficiente para recomendar el uso de glutamina en los pacientes críticos sometidos a nutrición parenteral, ya que en los estudios realizados se han observado buenos resultados atribuibles a la glutamina y no se han observado efectos adversos (89,90). La glutamina juega un papel importante tras la agresión sufrida en el paciente crítico ya que induce mecanismos de protección provocando el aumento en la producción de proteínas de choque térmico. Estas proteínas tienen una función protectora frente al daño celular y frente a mecanismos de isquemia/reperfusión (91), lo que le confiere un papel potencial para evitar el progreso a fallo multiorgánico. Aunque no hay evidencia suficiente del uso de la glutamina en pacientes sépticos con nutrición parenteral, si se podría valorar su administración (83) después de resolverse el cuadro de sepsis grave o shock séptico (40).

Pueden ser beneficiosas las fórmulas de nutrición parenteral ricas en omega-3 en los pacientes sépticos (92–94), sin embargo, no se recomienda su uso rutinario hasta que

no se disponga de mayor evidencia. Debe de evitarse el uso de omega-6 en estos pacientes sépticos (83).

Para pacientes críticos en situación séptica, solo se ha publicado un estudio sobre los efectos de dietas enriquecidas en farmaconutrientes “inmunomoduladores” (arginina, omega-3, nucleótidos, antioxidantes). Este estudio indicaba que una dieta enriquecida se asocia con menor mortalidad en comparación con el uso de una dieta control (95). No se recomienda el empleo de selenio a dosis altas porque no se dispone de evidencia suficiente.

Soporte hematológico

La administración de hematíes se recomienda cuando la hemoglobina está por debajo de 7 g/dL, para mantenerla en adultos entre 7 y 9 g/dL, y la de plaquetas cuando éstas se encuentren en sangre inferior a 10000/mm³. No se recomienda el uso de eritropoyetina para tratar la anemia en estos pacientes, ni de plasma fresco congelado, ni antitrombina para corregir las pruebas de coagulación que se hacen en el laboratorio en ausencia de hemorragia activa o procedimientos invasivos (41,96).

Las inmunoglobulinas se utilizan en casos específicos pero no se recomienda su uso generalizado (40,97). Las terapias inmunomoduladoras (administración de interferón gamma, eliminación de inmunosupresores, administración de factor estimulante de colonias de granulocitos y/o monocitos), no están recomendadas en pacientes con sepsis grave o shock séptico (40,98).

Tratamiento antibiótico

En la primera hora tras diagnosticar la sepsis grave o el shock séptico al paciente se le incluye en un tratamiento antibiótico empírico que reduce el riesgo de mortalidad (99). Aquellos pacientes con riesgo de presentar patógenos multiresistentes (que tengan una infección nosocomial que esté relacionada con los cuidados sanitarios en un ámbito con alta prevalencia de estos patógenos, que haya habido un uso de antibióticos de selectores para los mismos, que haya habido una colonización previa, etc), deberán

recibir un tratamiento antibiótico empírico que sea selectivo a los patógenos que se hayan identificado anteriormente, o que sea común en el área local (40,100).

En los pacientes con sepsis grave o *shock* séptico se utiliza un tratamiento antibiótico empírico combinado en los siguientes casos: pacientes con neutropenia (101); pacientes con riesgo de sepsis por patógenos bacterianos difíciles de tratar y resistentes a múltiples fármacos, tales como *Acinetobacter* y *Pseudomonasspp.*, pacientes con *shock* séptico e infecciones bacterianas causadas por *Streptococos pneumoniae*, en peritonitis secundaria con fallo multiorgánico o terciaria, siempre individualizando en casos especiales. En general, no deben superarse los 5 días de la combinación de fármacos (102,103).

Uno de los motivos de fracaso terapéutico es la insuficiente concentración de antibiótico en el lugar de la infección (una pobre penetración en el foco infeccioso), por tanto, se debe considerar la distribución del antibiótico a la hora de seleccionar una terapia antimicrobiana (104).

1.1.2. Estado nutricional del paciente crítico.

El término “desnutrición proteica-calórica” fue definido por el Comité de Nutrición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1971, en el cuál incluyeron las diferentes fases de la desnutrición, desde moderada hasta grave. Posteriormente, Cadwell et al. (1981) definieron el estado de desnutrición que se aplica al paciente hospitalizado como el “estado de morbilidad secundario a una deficiencia relativa o absoluta, de uno o más nutrientes, que se manifiesta clínicamente o es detectado por medio de exámenes bioquímicos, antropométricos, topográficos y fisiológicos”. Posteriormente fue definida la desnutrición como el “estado de nutricional en el que una deficiencia o desequilibrio de energía, proteínas, y otros nutrientes, causan efectos adversos en el organismo con consecuencias clínicas y funcionales. Es muy común encontrarse desnutrición en los pacientes críticos (105) y esta desnutrición contribuye al aumento de la gravedad del paciente (106–110), además del aumento de mortalidad (111).

Hoy en día, la desnutrición sigue siendo uno de los principales problemas de salud en todo el mundo y también la patología mayormente implicada en el aumento de la

morbimortalidad afectando al 30-50% de los pacientes hospitalizados (112), demandando atención por parte de los profesionales de salud responsables del cuidado y asistencia del paciente (113). Además, parece ir incrementándose el problema nutricional a medida que aumenta la estancia hospitalaria del paciente (112), y los que presentan desnutrición desarrollan una peor evolución clínica (113).

La desnutrición se ve influenciada por factores genéticos, metabólicos y hormonales del organismo humano, y conlleva efectos perjudiciales desde el desarrollo fetal intrauterino hasta la vida adulta. Hoy en día, los parámetros bioquímicos del estado nutricional se utilizan como un indicador de severidad de la enfermedad o como un indicador pronóstico, más que como un marcador diagnóstico. Hacer un diagnóstico oportuno e identificar la desnutrición de forma temprana es fundamental en los pacientes hospitalizados para disminuir las complicaciones, en especial las infecciones, tiempo de estancia hospitalaria y mortalidad, contribuyendo así a mejorar la evolución clínica (114,115). Es importante identificar a los pacientes que se encuentran desnutridos para poder instituir un soporte nutricional adecuado. Diversos estudios (116–121), demuestran que actualmente en la población general hospitalaria la desnutrición está subestimada y no se trata lo suficiente.

1.1.2.1. Valoración nutricional.

La valoración nutricional se puede hacer analizando algunos parámetros analíticos que van a determinar el estado nutricional en el que se encuentra el paciente antes y durante el ingreso en la UCI. Es importante hacer la valoración nutricional lo antes posible para detectar los enfermos con riesgo de desnutrición e instaurar un tratamiento de soporte lo antes posible. Resulta muy complicado hacer esta valoración ya que los parámetros utilizados para ver el estado nutricional se ven afectados por el tratamiento de soporte y por la alteración metabólica que padecen estos pacientes con *shock* séptico (122). Los parámetros para el estudio nutricional del paciente crítico son los siguientes:

Proteína visceral

Albúmina: su disminución está relacionada con un pronóstico negativo, con un incremento en la aparición de complicaciones y de la mortalidad. Sin embargo, tiene poca sensibilidad en los cambios en el estado nutricional, por ello, no se considera un

buen parámetro de seguimiento nutricional. Son indicativos de una situación grave de desnutrición valores inferiores a 2.1 g/dL (122).

Prealbúmina: Sus valores se ven disminuidos en estados de malnutrición, en situaciones de infección y en insuficiencia hepática, y aumentados en la insuficiencia renal (sólo en esta última se utiliza como parámetro válido en la evaluación nutricional). Tiene una vida media corta (2 días); esto la convierte en un buen parámetro de evolución y seguimiento en el paciente crítico (123).

Proteína ligada al retinol: sus valores se ven disminuidos en la enfermedad hepática, en la infección y en el estrés grave, y se ven aumentados con el aumento en la ingesta de vitamina A.

Transferrina: Sus niveles se ven alterados en el paciente crítico cuando existe un déficit crónico de hierro, en la politransfusión y cuando hay alteraciones en la absorción intestinal. No es útil para la evaluación del estado nutricional. Sus valores se encuentran aumentados en la anemia ferropénica y disminuidos en la enfermedad hepática, sepsis y enfermedad intestinal.

Somatomedina: Se utiliza en el paciente crítico para medir la intensidad de la respuesta metabólica a la agresión, pero su coste monetario es elevado y su determinación compleja por ello, sólo se utiliza en investigación.

Proteína somática

Creatinina: en general procede del catabolismo de las proteínas, por tanto sus valores dependen del contenido muscular y la edad del paciente.

3-metilhistidina: es un aminoácido derivado del catabolismo muscular. Sus niveles se ven aumentados en dietas hiperproteicas y en situaciones de hipercatabolismo, infecciones y cirugía; y se ven disminuidos en pacientes desnutridos y en ancianos. Este parámetro es muy útil en la evolución del paciente crítico, sobretodo en la renutrición y fases de aumento del catabolismo (124).

Balance nitrogenado: este parámetro es útil en la etapa de renutrición en pacientes postoperados con estrés o con desnutrición moderada, también se puede utilizar como

índice de pronóstico nutricional, pero no es útil como parámetro de desnutrición y seguimiento nutricional.

Valoración de otros nutrientes

En cuanto a los lípidos, se pueden medir en plasma el colesterol total, LDL, HDL, triglicéridos, Apo A1, Apo B, lipoproteína lipasa A y el perfil de ácidos grasos, pero no son parámetros de evaluación del estado nutricional. En los pacientes que están desnutridos con insuficiencia renal, hepática y síndrome de malabsorción, cuando existen altos niveles de colesterol se ve incrementada la mortalidad.

En cuanto a los minerales, se pueden medir calcio, fósforo, magnesio y hierro, últimamente se han empezado a medir cinc, cromo, yodo, cobre (Cu), selenio (Se) y otros. Pero no se consideran parámetros de evaluación del estado nutricional. En cuanto a las vitaminas se pueden medir vitamina B12 (Vit B12), ácido fólico (Fol), vitamina D (Vit D) y otras.

1.1.2.2. Desnutrición en el paciente crítico.

La desnutrición puede ser complicada (trauma) o no complicada (crónica). En los dos casos se va a producir un incremento de la lipólisis y una disminución de las reservas de grasas y músculo esquelético. En desnutrición complicada, que es la que se produce en el paciente crítico, vamos a observar un aumento de las necesidades energéticas, de la producción de insulina y de las hormonas contrareguladoras, del agua corporal total y de la proteína visceral. En este estado vamos a observar que las cetonas están ausentes, el cociente respiratorio es de 0.85, la proteólisis y la gluconeogénesis están aumentadas y todo esto se traduce en una pérdida de peso (125).

Las tres fases de la recuperación de un trauma son: fase de resucitación, fase catabólica aguda y fase anabólica adaptativa. En estas tres fases, es muy importante el correcto aporte nutricional para poder contrarrestar las alteraciones hidroelectrolíticas, el aumento del gasto energético y la degradación proteica. Generalmente, el paciente restaura su estado fisiológico rápidamente, pero en situaciones de trauma de gran magnitud y/o en presencia de complicaciones infecciosas, se puede producir un estado

hipercatabólico de tal magnitud que termine provocando efectos destructivos en el organismo (126).

Cuando un paciente se encuentra en una situación de catabolismo prolongado y no se trata, pierde masa magra corporal que se traduce en una pérdida de peso y otras repercusiones como son retraso en la cicatrización, mayor susceptibilidad a las infecciones e incremento de morbimortalidad (3).

1.1.2.3. Recomendaciones nutricionales en el paciente crítico.

El aporte nutricional en el paciente crítico es un proceso complejo, ya que hay que considerar en cada momento la situación clínica y la evolución. No solo es importante valorar el aporte cuantitativo de macronutrientes, sino también la calidad de los mismos. Los micronutrientes, que hasta hace poco eran poco considerados, actualmente se están teniendo en cuenta cada vez más en los pacientes críticos.

Aporte energético

Se ha estimado que el paciente crítico con sepsis y fallo multiorgánico necesita unos requerimientos energéticos de aproximadamente 25-35 kcal/kg/día para pacientes con un índice de masa corporal (IMC) normal (127).

La Sociedad Europea de Nutrición Enteral y Parenteral (ESPEN) hace las siguientes recomendaciones: se persigue proporcionar una energía lo más cerca posible al gasto energético, con el fin de disminuir el balance energético negativo. En ausencia de calorimetría indirecta, el paciente crítico debe recibir 25 kcal/kg/día e ir progresando hasta conseguir los objetivos en los próximos 2-3 días. Durante la fase anabólica de recuperación, el objetivo es de 25-30 kcal/kg y durante la fase aguda de la enfermedad un aporte mayor a 20-25 kcal/kg se puede asociar a peores resultados. Pacientes con desnutrición severa deben recibir más de 25-30 kcal/kg/día por vía enteral que se suplementará con nutrición parenteral si los requerimientos no son alcanzados durante los dos primeros días (86).

La Asociación Americana de Gastroenterología (AGA) recomienda que el cálculo de aporte energético al paciente crítico se haga en función del IMC que éste tenga. En la **Tabla 4** se puede ver detallada esta recomendación (128).

Tabla 4.- Recomendaciones de aporte energético en función del IMC

Índice de masa corporal (kg/m²)	Necesidades energéticas (Kcal/kg/día)
< 15	35 – 40
15 – 19	30 – 35
20 – 29	20 – 25
≥ 30	15 – 20 (sin exceder > 2000 kcal/día en pacientes críticos)

Aporte de proteínas

El paciente crítico se encuentra en un estado hipercatabólico, con intensa destrucción proteica que es necesario reponer. Se produce una situación de estrés metabólico, donde los aminoácidos son liberados del músculo esquelético para contribuir a la gluconeogénesis, a la síntesis de moléculas del sistema inmunitario y a la reparación de los tejidos afectados, produciendo un aumento de la eliminación de nitrógeno. Por ello, las proteínas se encuentran degradándose y resintetizándose continuamente, por lo que se debe realizar un aporte proteico continuo para reponer las pérdidas. El aporte de proteínas debe ser adecuado y moderado (un aporte de 1.5 g/kg/día reduce el catabolismo proteico en un 70%), ya que la administración de grandes cantidades de proteínas puede dar lugar a un aumento de la degradación proteica neta (un aporte de 2.2 g/kg/día aumenta la degradación proteica neta). Existen 9 aminoácidos que el organismo no puede sintetizar, aminoácidos esenciales, en los que la única vía de acceso al organismo es a través de la alimentación, por tanto, también se debe hacer un aporte de estos aminoácidos.

Los requerimientos de proteínas para una persona sana se sitúan entre 0.8-1 g/kg/día. En pacientes que se encuentran en una situación de estrés metabólico los requerimientos pueden oscilar entre 0.8-2 g/kg/día. Las proteínas que hay que administrar deben aportar entre un 15-20% de las calorías totales que el individuo gasta al día, y que se debe comenzar con un aporte de 1.2-1.5 g/kg/día, e ir ajustándolo en función de los controles periódicos del balance nitrogenado y de los cambios en la urea plasmática. Las pautas recientes para el paciente crítico aconsejan una dosis mínima de 1.2-1.3 gr/kg/día para pacientes no obesos y de 2-2.5 gr/kg/día para pacientes obesos (129). No obstante, se han hecho estudios aleatorizados donde se ha observado que no hay un beneficio clínico con la ingesta proteica y además se produce un aumento de la ureagénesis. Así ocurre en el estudio de van Zanten et al. (130), donde se investigó una

dieta alta de proteínas en pacientes críticos obesos. Los pacientes se dividieron en dos grupos, un grupo recibió 1.49 gr/kg/día y el grupo control recibió 0.76 gr/kg/día. Se observó que el grupo con mayor aporte de proteínas tenían niveles de proteínas más aumentado lo que provocó que la excreción urinaria de nitrógeno fuera más elevada. En otro estudio (131) se observó que después de la administración de proteínas al paciente crítico, proporcionados durante 5-6 días de nutrición parenteral, dos terceras partes se desperdiciaban con la formación de urea, lo que además provocaba una prolongación en el tratamiento renal sustitutivo hasta más de dos semanas después.

En concreto, en los pacientes con sepsis, se ha estimado que se debe hacer un aporte proteico de entre 1.5-2 g/kg/día (132), sin embargo, en pacientes con pérdidas excesivas de nitrógeno, éste aporte puede ser aún mayor. Además hay que tener en cuenta que los pacientes con fallo renal o hepático tendrán alteradas las proteínas. En situaciones de estrés, el organismo va a requerir más cantidad de proteínas que de energía, ya que la energía aportada por las proteínas es más utilizada en este estado que en las personas sanas.

Con respecto al aporte nutricional enteral, se puede llevar a cabo mediante proteína intacta, hidrolizados proteicos, aminoácidos libres o mezclas de todos ellos en diferentes proporciones. En cuanto a la nutrición parenteral, se pueden utilizar diferentes fórmulas de aminoácidos como soluciones estándar, soluciones enriquecidas en aminoácidos de cadena ramificada y fórmulas hepáticas.

El empleo de proteínas séricas y caseína en pacientes críticos parece mostrar beneficios en el valor biológico, el coeficiente de eficiencia proteica y de utilización neta. Pero el empleo de suplementos en estos pacientes no está claro que reduzcan la morbilidad o mortalidad. La arginina y la glutamina han sido las más estudiadas.

La glutamina es el aminoácido más abundante del músculo esquelético del organismo. Se trata de un aminoácido no esencial, es decir, el organismo puede sintetizarlo a partir de los grupos amino procedentes de los alimentos. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, el organismo obtiene la glutamina del músculo, haciendo que disminuya la masa de éste. En estas condiciones es necesaria su ingestión en la dieta como suplementación. Por lo tanto, la glutamina es considerada como esencial en el individuo con estrés.

En diversos estudios (133–135), han quedado demostrados los beneficios de la glutamina por el papel que desarrolla en la estabilidad del equilibrio ácido-base, en el aprovisionamiento de combustible primario para las células de rápida proliferación, en la interacción de la mucosa gastrointestinal, como sustrato en la gluconeogénesis, en la disminución de las infecciones, en la síntesis de glutatión (GSH) y arginina, en la disminución de la resistencia a la insulina y la respuesta inflamatoria.

En un estudio aleatorizado, doble ciego, realizado a 84 pacientes críticos en la UCI en los que no estaba indicada la nutrición enteral, se observó que al administrar una solución parenteral suplementada con glutamina reducía la mortalidad de estos pacientes a los seis meses en un 24% y reducía los costes de la UCI por superviviente en un 50% (136). Resultados similares se observaron en otro estudio también en pacientes de la UCI, donde la suplementación con glutamina se asoció a una reducción de las complicaciones infecciosas y a una disminución de la estancia en UCI, sobretudo en la glutamina administrada de forma parenteral (137). En otro estudio realizado en pacientes de la UCI con nutrición parenteral suplementada con glutamina, se observó un aumento del GSH, un aumento de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) y una disminución del SOFA, en comparación con el grupo de pacientes de la UCI con nutrición parenteral sin suplementación con glutamina (138).

La arginina es un aminoácido semiesencial, es decir, considerado esencial bajo ciertas condiciones. Existen controvertidas opiniones sobre los beneficios de la arginina. Por un lado, se sostiene el potencial tóxico que la suplementación con arginina tiene sobre los pacientes con sepsis (139). Por otro lado, se defiende que es escasa la arginina en plasma en los pacientes con sepsis y que debería suplementarse, advirtiéndose que su capacidad de aumentar el óxido nítrico puede provocar una inestabilidad hemodinámica por la hipotensión producida, no obstante, se sugiere que este efecto secundario se puede evitar administrando la arginina de forma continua y no administrando un bolo (140). En un estudio aleatorizado de 2419 pacientes críticos (141), se observó que la administración de fórmulas comerciales con alto contenido en arginina se asoció con una reducción significativa en las complicaciones infecciosas y una menor mortalidad en comparación con otras dietas que mejoran el sistema inmune. En general, la población quirúrgica parece haber sido la más beneficiada por la suplementación de arginina (139).

Aporte de carbohidratos

La glucosa es el principal substrato calórico que utiliza el paciente crítico, aunque en algunas situaciones de agresión la fuente de energía puede ser una mezcla de lípidos e hidratos de carbono. Es importante ajustar el aporte de glucosa para que los niveles de glucemia no sobrepasen 140 mg/dL, para ello se deben aportar los niveles adecuados de insulina.

En el paciente séptico el consumo de la glucosa se encuentra incrementado, de manera que se puede considerar hasta cierto punto, una administración exógena de glucosa. Los hidratos de carbono que hay que administrar en el paciente séptico, deben aportar entre un 50-60% de las calorías totales, de esta manera evitamos que se lleve a cabo una oxidación excesiva de glucosa. Su aporte debe ser adecuado y moderado, evitando suministrar más de 7 g/kg/día de hidratos de carbono en términos absolutos, ya que el aporte excesivo puede elevar la glucemia. En un estudio realizado en la UCI a 1500 pacientes críticos sometidos a ventilación mecánica (142), se analizó la influencia de la insulina en el mantenimiento de las concentraciones de glucosa en sangre, observándose una reducción de los episodios de septicemia así como en la mortalidad de los individuos donde se mantuvieron unos niveles de entre 80-110 mg/dL administrando insulina intensiva, respecto a los que tuvieron un tratamiento convencional (infusión de insulina solo si el nivel de glucosa en sangre excedió 215 mg/dL y mantenimiento de glucosa a un nivel entre 180 y 200 mg/dL).

Aporte de lípidos

El aporte de lípidos es fundamental para evitar el déficit de ácidos grasos esenciales, como el ácido linoleico (debe aportarse al menos un 2% de las calorías) y el ácido linolénico (debe aportarse al menos un 0.5% de las calorías). También es útil para mantener la estructura de las membranas celulares y que éstas puedan llevar a cabo su función moduladora de las señales intracelulares (128). Además, los lípidos tienen otras funciones como el transporte de vitaminas liposolubles, ser precursores de eicosanoides, de la reducción de citoquinas, y su relación con la expresión génica. Actualmente, se están empleando en el soporte nutricional triglicéridos de cadena larga (de las series n-3, n-6 y n-9) de forma individual o en combinación al 50% con triglicéridos de cadena

media, o como lípidos estructurados. La cantidad mínima sería de 1 g/kg/día, para evitar el déficit de ácidos grasos esenciales, no llegando a sobrepasar 1.5 g/kg/día. En el caso de que los niveles de triglicéridos en sangre superen los 400 mg/dL, el aporte de lípidos debe suspenderse.

En pacientes con sepsis se pueden utilizar los lípidos como fuente de energía exógena, pero la composición más adecuada de estos es controvertida. Para los pacientes con sepsis, los lípidos como fuente de energía suponen dos ventajas:

- Los lípidos son muy energéticos, aportando 9 kcal/g, lo que permite aportar mucha energía en poco volumen puesto que los pacientes con sepsis tienen una restricción de volumen.
- Los lípidos tienen un coeficiente respiratorio inferior al de los hidratos de carbono, por lo que los pacientes con sepsis que tienen altas concentraciones de CO₂, pueden disminuir dichas concentraciones con la oxidación de los lípidos.

En el aporte lipídico del paciente séptico, hay que tener en cuenta que los ácidos grasos de cadena larga van a tener dificultad para atravesar la membrana mitocondrial (por una alteración en el transportador de la acilcarnitina). Sin embargo, los ácidos grasos de cadena media no van a tener este problema al no requerir de carnitina (143).

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-3 y n-6 se ha demostrado que son potentes moduladores de la respuesta inmune. Los investigadores han puesto muchos esfuerzos para optimizar la relación de PUFA n-3 a n-6 en el componente lipídico de la nutrición parenteral total y así, optimizar sus efectos beneficiosos en el entorno clínico. Para alcanzar los niveles óptimos de ácidos grasos omega-3 en la membrana celular para tener los efectos beneficiosos sobre la distribución de las prostaglandinas, por una vía enteral se requiere entre 3 y 5 días, y por vía parenteral solo se requieren 3 horas para empezar a ver la respuesta clínica (144,145). En un estudio con pacientes críticos que recibían nutrición parenteral suplementada con ácidos grasos omega-3, se observó que se producía un descenso del uso de antibióticos, de la mortalidad y de la estancia en UCI (146).

Requerimientos de vitaminas y minerales

En general, existen datos para considerar de gran importancia a los micronutrientes como Zinc, Cobre, Manganeso, Cromo, Selenio, Molibdeno y algunas vitaminas (A, B, C y E), para los pacientes críticos, pero los requisitos específicos no han sido establecidos (128,147).

Minerales

En el caso de los minerales el Zinc y el Cobre son los más nombrados en la bibliografía. El Zinc participa en el proceso de reparación de las heridas y su carencia puede ser perjudicial para la inmunocompetencia del individuo. En el paciente crítico es necesario añadirlo en la nutrición enteral. Un aporte de 4.5-6 mg/día es suficiente, aunque se puede administrar hasta 13 mg/día. Si el paciente presenta pérdidas intestinales importantes, se puede administrar un suplemento de 12.2 mg/día. Es importante que no haya un exceso de zinc porque puede influir en el metabolismo del cobre.

En el caso del Cobre, se considera suficiente un aporte de 2-3 mg/día en los pacientes críticos con nutrición enteral. Se pueden incorporar además otros elementos traza a la nutrición enteral como el Manganeso (0.8 mg/día), el Cromo (0.1 mg/día) y el Selenio (hasta 120 mg/día). En estudios realizados a pacientes sépticos se han encontrado que los niveles de Cobre y Zinc estaban en el rango normal, mientras que los niveles de Selenio y Hierro eran menores que los valores de referencia (148). Carver (149) concluye que se han visto más asociaciones de niveles de Hierro, Selenio y Zinc con la prevención de enfermedades y tratamientos, que otros elementos como el Cobre, Cromo y Manganeso, de los que existen pocos datos. En otro estudio de Shanbhogue (150), se concluyó que los niveles séricos de Hierro y Zinc se ven afectados profundamente por el efecto séptico y el estrés quirúrgico, sin embargo, los de Cobre no se ven modificados. Por otro lado, algunos estudios avalan los beneficios de administrar Cobre a pacientes sépticos (151).

Vitaminas

Con respecto a las vitaminas, no está establecido en la nutrición artificial del paciente crítico un aporte vitamínico, pero si se considera imprescindible que los requerimientos de vitamina A, complejo B, C y E, se encuentren en los rangos óptimos y reponerlos si hay una carencia.

Después de estudiar la concentración de vitamina A, E, B1, Vit B12 y Folen 129 pacientes críticos, se observó que el 43% presentaba una deficiencia bioquímica de una de estas 5 vitaminas al ingreso en la UCI (152).

Vitamina B1

La vitamina B1 o tiamina es una vitamina hidrosoluble que forma parte del complejo B. Su estructura química consiste en dos estructuras químicas interconectadas (un anillo de pirimidina con un grupo amino y un anillo tiazol azufrado unido a la pirimidina por un puente metileno). La enzima tiamina-pirofosfoquinasa sintetiza el pirofosfato de tiamina que es la forma activa de la tiamina, para ello requiere de adenosina trifosfato (ATP) y Magnesio.

El pirofosfato de tiamina actúa como coenzima en el metabolismo de los hidratos de carbono. En general, actúa como un cofactor en reacciones de descarboxilación, por ejemplo, en la conversión de piruvato a acetil-CoA, en la conversión de 2-oxoglutarato a succinil-CoA y en la vía de las pentosas es cofactor de la transcetolasa. Además, participa en la síntesis de sustancias que regulan el sistema nervioso. La deficiencia de tiamina se ha asociado con insuficiencia cardíaca, trastornos neurológicos, estrés oxidativo (acidosis láctica y sepsis) y síndrome de realimentación. La carencia de la tiamina en el organismo provoca la enfermedad del beriberi y el síndrome de Korsakoff. La variante fulminante del beriberi se ha observado en pacientes críticos que responden drásticamente a la administración de tiamina (153).

En el paciente crítico nos podemos encontrar un déficit de tiamina ya que ésta está muy relacionada con el metabolismo de los hidratos de carbono y en estos pacientes se produce un aumento de la demanda metabólica. Además, la nutrición parenteral o

enteral a la que está sometido el paciente crítico, los diuréticos y la hemofiltración, podrían reducir aún más los niveles de tiamina.

Numerosos estudios avalan que los pacientes críticos con requerimientos nutricionales pueden estar en riesgo de déficit de tiamina y que en éstos pacientes es importante su temprana reposición (154–160). Este déficit no se ha relacionado con la mortalidad ni con el estrés oxidativo (152,161). Los resultados controvertidos entre unos estudios con respecto a la implicación clínica de la deficiencia de tiamina se pueden explicar por los diferentes diseños de estudio, las diferentes poblaciones de pacientes y los diferentes métodos utilizados para medir los niveles de tiamina en sangre (transcetolasa eritrocítica o medición directa).

Se han observado cambios importantes con la administración de tiamina en el paciente crítico. En un estudio (162), se observó que la administración de una dosis de tiamina aumenta el consumo de oxígeno en el paciente crítico con ventilación mecánica. En otro estudio (163), se observó que la acidosis láctica mejoraba con la administración de tiamina en el paciente crítico.

Por otro lado, un estudio realizado a pacientes críticos suplementados con vitaminas del grupo B (B1, B2 y B6) (164), se observó que aumentaba los niveles de flavinadeninucleótido (FAD) y el piridoxal fosfato en los hematíes, pero no en el plasma con respecto a un grupo de pacientes críticos no suplementados, confirmando que el plasma no sería un buen biomarcador para medir estos parámetros.

En situaciones de deficiencia de tiamina, se ha visto que hay una acidosis metabólica, debido a un inadecuado metabolismo del ácido láctico que tiende a acumularse (165–167). En 30 pacientes con *shock* séptico no encontraron correlación entre el déficit de tiamina y el aumento de acidosis láctica, sin embargo, cuando se excluyeron a los pacientes con pruebas hepáticas alteradas, sí se observó correlaciones negativas entre las concentraciones de tiamina y la acidosis láctica ($r = -0.53$, $P < 0.01$) (156). Cuando se administra tiamina a pacientes con *shock* séptico excluidos los pacientes con disfunción hepática (200 mg/día, durante 7 días), se observa que no hay variación significativa en los niveles de lactato en comparación con los pacientes a los que se les administra placebo. Sin embargo, se vio que aquellos pacientes que tenían una deficiencia de tiamina al ingreso, después de la administración de tiamina,

manifestaban una disminución de lactato a las 24 horas, así como una reducción la mortalidad (168).

En pacientes con *shock* séptico se ha visto que existe un déficit de tiamina de entre un 20-70% dependiendo del valor de corte utilizado (169). En un estudio realizado a 108 pacientes con *shock* séptico (161), se determinó que un 71.3% tenían deficiencia de tiamina.

Se ha visto que no existe una estandarización en la metodología de medición de la tiamina en la atención clínica y, como consecuencia, no se pueden comparar los resultados, siendo necesario establecer un método de referencia (170). En la práctica diaria de la UCI, las mediciones de los niveles sanguíneos de tiamina no son pruebas de laboratorio ampliamente disponibles y tardan varios días en realizarse, por tanto, no ayudarán en la toma de decisiones en caso de *shock* séptico. La administración de tiamina, tanto a dosis altas como a dosis bajas, tiene efectos adversos muy poco frecuentes (171) y es por ello que se recomienda su administración sin esperar los resultados de los niveles de tiamina (169). Según las recomendaciones de la ESPEN para la nutrición parenteral en la UCI, la administración de suplementos de tiamina deben ser de 100 a 300 mg/día durante los primeros tres días en la UCI para todos los pacientes con sospecha de deficiencia de tiamina (86). Sin embargo, una dosis de hasta 500 mg puede ser necesaria para pacientes con *shock* séptico (169).

Vitamina B12

La Vit B12 es una molécula compleja que presenta una forma como cofactor, la coenzima Vit B12, y requiere de un oligoelemento esencial para su acción, el Cobalto. La Vit B12 se suele aislar en forma de cianocobalamina, que contiene un grupo ciano unido al Cobalto. En la forma 5'-desoxiadenosilcobalamina el grupo ciano está reemplazado por el grupo 5'-desoxiadenosilo y es el cofactor de la metilmalonil-CoA mutasa que cataliza, de forma reversible, el paso de metilmalonil-CoA a succinil-CoA. La Vit B12 también actúa en la formación de S-adenosilmetionina a partir de ATP y metionina. Esta vitamina no se sintetiza ni en planta, ni en animales y sólo pueden sintetizarla unas cuantas especies de microorganismos, por lo que es esencial. La Vit B12 se obtiene de la carne, los huevos y productos lácteos, entre otros (172).

Las necesidades de Vit B12 son relativamente bajas en una persona sana, 3 µgr/día. Los criterios para diagnosticar una deficiencia de Vit B12 incluyen una determinación en suero de cobalamina de < 148 pmol/L (200 ng/L) en presencia de signos y síntomas y/o parámetros hematológicos de deficiencia de Vit B12 (por ejemplo, volumen corpuscular eritrocitario alto), o una cobalamina sérica de <148 pmol/L junto con unos niveles séricos altos de homocisteína o ácido metilmalónico (MMA) (173).

La carencia de Vit B12 puede causar una enfermedad grave, la anemia perniciosa, que se produce por la incapacidad de absorber la forma funcional de la Vit B12 desde el intestino, donde es sintetizada por las bacterias intestinales, o adquirida por la ingesta de carne. Las personas que padecen esta enfermedad, no producen la cantidad suficiente de factor intrínseco, una glucoproteína esencial para la absorción de la Vit B12. La patología de la anemia perniciosa cursa con anemia y un deterioro progresivo del sistema nervioso central. Estos síntomas son aliviados con la administración de grandes dosis de Vit B12. En general, la deficiencia de Vit B12 afecta al 15% de los pacientes mayores de 65 años y produce trastornos hematológicos y neurológicos (174). También puede ser un riesgo independiente de la enfermedad arterial coronaria (175).

En algunos estudios se puede ver que la deficiencia de algunas vitaminas, como pueden ser la Vit B12 o el ácido fólico, está presente en pacientes críticos, incluso la necesidad de reemplazarlos cuando estos niveles están muy bajos (152). Sin embargo, los niveles elevados de Vit B12 están asociados con el paciente crítico más severo (176). La Vit B12 tiene propiedades antioxidantes, proporcionando un efecto de ahorro del GSH. El mecanismo de reacción proviene de la estimulación de la actividad de la metionina sintasa y la reacción con radicales libres de hidrógeno y nitrógeno. En un estudio de Manzanares et al. (177), se propone que un tratamiento con dosis altas de Vit B12 por vía parenteral podría beneficiar a los pacientes con *shock* séptico. Por otro lado, se sabe que los niveles elevados de Vit B12 en la sangre están asociados con enfermedades inflamatorias y también proporcionan un mal pronóstico en pacientes críticos (174). Los niveles plasmáticos de Vit B12 también se han asociado con otros biomarcadores de fase aguda, como la proteína C reactiva (PCR) y el SOFA en pacientes críticos (178,179).

Ácido Fólico

El Fol o vitamina B9 es la forma oxidada del tetrahidrofolato, y se encuentra en esta forma en los humanos y en los alimentos (180). Es una vitamina esencial para los mamíferos y se convierte en dos pasos en tetrahidrofolato por acción de la enzima dihidrofolatoreductasa. Este cofactor actúa como dador de unidades monocarbonadas. La reducción inicial a dihidrofólico es la limitante. Las bacterias pueden sintetizar su propio ácido fólico desde el ácido p-aminobenzoico (PABA) y la adición de una sustancia llamada pteridina a la forma de ácido dihidropteroico, después se le añade ácido glutámico (Glu) para producir ácido dihidrofólico, y después pasa a ácido tetrahidrofólico a través de la acción de la dihidrofolatoreductasa. El Fol participa en la síntesis de purinas y timidilato, que son necesarios para la producción de ATP mitocondrial y citosólico, así como en la producción total de nucleótidos trifosfato y desoxi-NTP (181).

Los humanos no somos capaces de sintetizar esta molécula de novo, por lo tanto, la dieta es la única fuente de Fol, encontrándose de manera natural en los alimentos vegetales. El Fol es hidrosoluble y las cantidades sobrantes de la vitamina se filtran a través de la orina, es decir, el cuerpo no almacena el Fol, además de ser necesario para la síntesis de ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA) y por lo tanto para la división celular. Por ello, ayuda en el crecimiento de los tejidos y en la síntesis eritrocitaria, por lo que previene la anemia. Actúa en el metabolismo proteico junto con la Vit B12 y la vitamina C.

La carencia de Fol, en la que han desaparecido todas las formas de tetrahidrofolato, también produce anemia megaloblástica, por las mismas razones que la Vit B12. Esta carencia puede causar además, diarrea, úlceras y retraso en el crecimiento. También puede provocar la disminución de la disponibilidad del N5-metiltetrahidrofolato necesario para la metionina sintasa. Esto puede provocar un incremento de la homocisteína en sangre, asociado con enfermedades cardíacas, hipertensión y embolias (que pueden tratarse con suplementos de fosfato), donde los niveles de homocisteína pueden ser los responsables del 10% de todos los casos de enfermedad cardíaca (182,183).

Los estudios sobre los niveles séricos de Fol en pacientes críticos y con sepsis son controvertidos. Algunos estudios (184) muestran que los niveles de ácido fólico

disminuyen, y en otros (185,186) observan que no hay diferencias con respecto los pacientes sanos. No se ha registrado el uso de Fol como marcador de morbilidad y mortalidad en pacientes con *shock* séptico, sin embargo, en un estudio se encontró una asociación de niveles bajos de Fol con pacientes febriles con sepsis (187).

Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico es un nutriente esencial para el ser humano y soluble en agua con acciones pleiotrópicas. Es un potente antioxidante que refuerza el sistema inmunitario y también interviene en el metabolismo de las lipoproteínas. La vitamina C participa en la síntesis de carnitina y colágeno, lo que la hace imprescindible para mantener ciertas estructuras proteicas del organismo como son: la piel, los tendones ligamentos, vasos sanguíneos y cicatrices. El déficit de vitamina C afecta a la estabilidad de estas estructuras y a la cicatrización de heridas.

La carencia de esta vitamina puede provocar la enfermedad del escorbuto. La cantidad necesaria diaria de vitamina C para evitarlo es de 10 mg, aunque se recomienda disponer de la dieta de 100 a 200 mg de vitamina C al día para mantener el organismo saludable y prevenir afecciones crónicas. Varios ensayos han utilizado una dosis de repleción de vitamina C de 0.5-3 g/día observándose resultados de recuperación en la insuficiencia orgánica (188). Los resultados de diversos estudios avalan que un tratamiento de vitamina C en los pacientes con *shock* séptico de 50-200 mg/kg/día o 6 g/días con o sin hidrocortisona y tiamina, reduce la dosis de vasopresores y promueve la recuperación, pero no se ha visto que disminuyan la mortalidad (189–191).

En el paciente crítico se produce un aumento de los requerimientos de ácido ascórbico, produciéndose acumulación del ácido ascórbico en los neutrófilos. A la vez que las glándulas suprarrenales secretan vitamina C, ésta se acumula desencadenando la producción de cortisol (192). Además, la vitamina C se requiere para sintetizar norepinefrina, hormonas peptídicas y cortisol.

La deficiencia aguda de ácido ascórbico en los pacientes críticos es muy común, y ésta puede contribuir al empeoramiento de la hipotensión, la inflamación, la filtración capilar, el compromiso microcirculatorio, la lesión oxidativa de los órganos, el deterioro

de la defensa inmune y la cicatrización de la heridas. Se ha sugerido la importancia de administrar vitamina C en pacientes sépticos por la mejora en la síntesis de vasopresores endógenos (ya que la vitamina C participa en el mecanismo bioquímico para sintetizarlos), y así mejorar el requerimiento de vasopresores administrados exógenamente (193). La administración de vitamina C, tiamina e hidrocortisona redujo los días de estancia en UCI en pacientes con sepsis y *shock* séptico (194).

Vitamina D

La Vit D o calciferol es un heterolípido del grupo de los esteroides. El calcitriol ($1\alpha,25$ -dihidroxicalcitriol) es la hormona de la Vit D, la forma activa, se obtiene a partir de la Vit D por reacciones de hidroxilación enzimáticas en el hígado y los riñones. La Vit D se puede obtener de la dieta (D2 y D3) o por fotólisis del 7-deshidrocolesterol al exponer la piel al sol (D3).

La síntesis de Vit D inducida por la luz del sol comienza en la piel y continúa generando 1,25-dihidroxivitaminaD3 [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] biológicamente activa por dos hidroxilaciones secuenciales en el hígado para producir 25-hidroxivitamina D [$25(\text{OH})\text{D}$] y en los riñones para producir $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ (195–197). Diversos estudios han demostrado que la Vit D tiene varios efectos protectores sobre el sistema inmunológico, la regulación de la secreción de hormonas y la proliferación y diferenciación celular (198). Al limitar la liberación de varios mediadores proinflamatorios, la VitD puede minimizar la respuesta del huésped a las infecciones bacterianas y reducir el efecto general en el cuerpo.

El calcitriol actúa de forma combinada con la parathormona en la homeostasis del calcio, regulando la concentración de calcio en la sangre y el equilibrio entre deposición y movilización de calcio en el hueso. La carencia de Vit D o defectos en la biosíntesis provocan una enfermedad grave, el raquitismo, en la que los huesos son débiles y están mal formados. Esta enfermedad se cura de manera espectacular con la administración de Vit D.

En la actualidad se cree que la insuficiencia VitD (entre 20-30 ng/ml) y la deficiencia (menos de 20 ng/ml) son altamente prevalentes (199). La deficiencia de Vit D está presente en un 30-60% de los pacientes de la UCI en todo el mundo. Diversos

estudios han observado que la deficiencia de Vit D está relacionada con un exceso de morbilidad y mortalidad en adultos y niños en la UCI (200).

Existen datos que sugieren que el metabolismo de la ruta del GSH, que es clave para la regulación redox y la inmunomodulación, se ve afectado por el estado de la Vit D, en pacientes críticos (201).

Por otro lado, en un estudio que abordaba todos los micronutrientes en paciente crítico con enfermedades infecciosas calculándose el estado de micronutrientes en sangre, se observó que la incidencia de la deficiencia de Zinc fue de 66.7% (n = 40), de Selenio fue de 46.6% (n = 29), de tiamina fue de 39.7% (n = 27), de vitamina B6 fue de 35.3% (n = 24) y de Vit B12 de 14.1% (n = 9) (202).

1.2. Estrés oxidativo en paciente crítico.

1.2.1. Moléculas que intervienen en el estrés oxidativo.

Durante el metabolismo, la molécula de oxígeno se reduce a agua formando una serie de especies intermedias reactivas de oxígeno: anión superóxido (O^{2-}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión hidroxilo ($\cdot OH$) (203). Para contrarrestar estas especies reactivas de oxígeno (ROS) se encuentran las defensas antioxidantes: superóxidodismutasa (SOD), catalasa, vitamina C y E, y GSH reducido. Cuando hay una producción excesiva de ROS o una defensa antioxidante inadecuada, se rompe este equilibrio homeostático (204). Durante una situación de sepsis en el paciente crítico podrían ocurrir ambos procesos.

1.2.1.1. Prooxidantes.

La gran mayoría de las ROS se producen en la cadena respiratoria y en las células fagocíticas (como los neutrófilos). En el sistema de transporte mitocondrial de todas las células aeróbicas del organismo, se produce la reducción, con cuatro electrones, de cada molécula de oxígeno. La citocromo c oxidasa es una enzima que se encuentra en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (complejo IV). En su centro activo se encuentran metales de transición como el Cobre (Cu^{2+}) y Hierro (Fe^{2+}). Estos iones pueden ser paramagnéticos y contienen electrones desapareados estables. Así, estos

metales de transición transportan los electrones desapareados, controlando las reacciones de oxígeno y evitando la formación de radicales libres (superóxido e hidroxilo).

Los radicales superóxido se forman por la adición de un único electrón al oxígeno proveniente del sistema de transporte de electrones y mediante un aporte energético exterior. Normalmente se forma cuando la cadena de transporte de electrones opera en presencia de oxígeno. La producción de radicales superóxido conduce finalmente a la aparición de peróxido de hidrógeno y de aniones hidroxilo. La SOD convierte el superóxido en peróxido de hidrógeno, a través de una reacción de dismutación: $2O^{2\cdot-}(O^{2\cdot-} + O^{2\cdot-}) + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. El peróxido de hidrógeno es bastante estable en ausencia de iones metálicos de transición, y contribuye a la formación de compuestos citotóxicos en los neutrófilos. Cuando se encuentra en exceso el peróxido de hidrógeno se convierte en agua sin causar daño alguno, por acción de la catalasa, la GPx u otras peroxidasas. Los radicales hidroxilos se pueden originar por la reacción de superóxido con peróxido de hidrógeno en presencia de iones metálicos (por lo general de Hierro y de Cobre). Los aniones hidroxilo son los radicales más reactivos y puede oxidar casi cualquier molécula biológica (205). Para que se generen los aniones hidroxilo catalizados por el Hierro, requiere que éste se encuentre en su forma reducida o ferrosa (Fe^{2+}), mientras que la mayoría del Hierro que se encuentra en el plasma se encuentra en su forma oxidada o ferrica (Fe^{3+}). El anión superóxido, además de estar implicado con el peróxido de hidrógeno en formar los aniones hidroxilo, también puede reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , contribuyendo aún más al aumento de la producción del anión hidroxilo. En el plasma, es el Hierro libre el capaz de producir las reacciones bioquímicas. Sin embargo, la gran mayoría de Hierro circula en forma ligada como medida de protección. La biología humana ha generado unos mecanismos para bloquear al Hierro en un estado donde no puedan formarse los radicales libres como son: utilizar moléculas para el metabolismo del Hierro (proteínas hemo), almacenamiento (ferritina) y el transporte (transferina).

El anión superóxido en presencia de metales de transición, puede ser convertido mediante una reacción redox en quinona, que es una especie radical más agresiva y puede causar un extenso daño celular (206).

Las ROS se producen a unos niveles bajos en condiciones normales del metabolismo aeróbico y el daño que causan en las células se repara constantemente. En

condiciones fisiológicas, las ROS están implicadas en la respuesta inflamatoria, tienen un papel fisiológico esencial en la respiración mitocondrial, en la producción de prostaglandinas así como en la defensa del organismo.

1.2.1.2. Antioxidantes.

Mecanismo de defensa Antioxidante

Los antioxidantes son producidos para contrarrestar la formación de radicales libres de manera fisiológica, contribuyendo así al equilibrio redox. Se pueden encontrar tanto dentro como fuera de la célula. No actúan de forma aislada sino en sinergia. Los antioxidantes primarios impiden la formación de los radicales libres mediante la eliminación de los precursores (el peróxido de hidrógeno es eliminado por la catalasa y la GPx). Los antioxidantes secundarios reaccionan con los radicales libres ya formados y los eliminan o los inhiben (Vitaminas C y E).

Antioxidantes intracelulares

La SOD promueve la conversión de superóxido en peróxido de hidrógeno. Se presenta en varias formas y puede encontrarse en varias localizaciones: en el citoplasma se encuentra la Cobre-Zinc-SOD, en la mitocondria la Manganeseo-SOD, y en la matriz extracelular la SOD extracelular.

La catalasa (usa como cofactores grupo hemo y Manganeseo) y la GPx convierten el peróxido de hidrógeno en agua (207). La catalasa es una enzima intracelular y el equilibrio de ésta con respecto a la SOD es fundamental para mantener el balance redox. La GPx es una enzima Selenio dependiente y requiere que el GSH se encuentre en su forma reducida. El GSH tiene otra actividad antioxidante directa que consiste en la donación de iones de hidrógeno para reparar el ADN dañado. El estrés oxidativo y los niveles de GSH reducido y oxidado también regulan muchos genes de expresión de proteínas antioxidantes como la Manganeseo, SOD, GPx, tiorredoxina y metalotioneína.

Antioxidantes de membrana

El interior hidrófobo de las membranas requiere un espectro diferente de antioxidantes. La Vitamina E (α -tocoferol), β -caroteno, licopeno y coenzima-Q son antioxidantes liposolubles cuya función es evitar que los ácidos grasos poliinsaturados se vean sometidos a una peroxidación lipídica y evitar la pérdida de integridad de la membrana. En el citosol y en la membrana de los eritrocitos también se puede encontrar la fosfolípido-hidroperóxido-glutatión peroxidasa, siendo la única forma intracelular que puede combatir el peróxido de hidrógeno que se encuentra formando hidroperóxidos en los ácidos grasos esterificados de los fosfolípidos (207).

Antioxidantes extracelulares

También se pueden encontrar ROS en el compartimento extracelular, debido a la activación de los neutrófilos. Los hematíes contienen Cobre-Zinc-SOD que elimina el superóxido y, catalasa y GPx que descomponen el peróxido de hidrógeno. La apotransferrina, lactoferrina y ceruloplasmina son proteínas plasmáticas de unión a metales que tienen funciones transportadoras y además tienen una función antioxidante.

La albúmina posee un grupo tiol oxidable que permite la eliminación de radicales libres y la unión de iones metales de transición reactivos. En el plasma también se encuentran un conjunto de moléculas más pequeñas que actúan como antioxidantes secundarios: vitamina E, vitamina C, ácido úrico y bilirrubina. El ácido ascórbico destruye al superóxido para formar ácido dehidroascórbico, y por otro lado, puede reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} pudiendo verse involucrado en la generación de hidroxilos catalizada por Hierro. De esta forma el ácido ascórbico puede tener una función tanto prooxidante como antioxidante. Existe una SOD extracelular que elimina el superóxido (207).

1.2.2. Equilibrio homeostático.

En condiciones fisiológicas existe un equilibrio homeostático entre la formación de ROS y su eliminación por las defensas antioxidantes del organismo (208). Cuando los niveles de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) se encuentran bajos, pueden actuar como señales que promueven la proliferación y diferenciación celular. Sin

embargo, cuando estos niveles se encuentran altos pueden conducir a una situación de apoptosis o muerte celular. La diferencia entre elevados ROS y un exceso de ROS será lo que determinará el destino de muchas vías fundamentales para la supervivencia y proliferación celular.

Las rutas redox son esenciales para mantener una homeostasis celular. En condiciones fisiológicas se mantiene un equilibrio adecuado entre la formación y la eliminación de ROS y RNS en las células a través de las vías enzimáticas pro y antioxidantes. Las fuentes que contribuyen a la formación de ROS y RNS pueden ser exógenas, como por ejemplo: contaminantes, tabaco, humo, drogas, xenobióticos o radiación, o endógenas, como las que se forman en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, el retículo endoplasmático y el complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa.

La mitocondria es un sitio primario de producción de superóxido. Este orgánulo contiene en su cadena de transporte de electrones los complejos I y III. Los ROS se producen en el complejo I durante el transporte de electrones inverso, donde los electrones entran en el complejo I a través de la unión de la coenzima Q (209). El complejo III es el que cataliza la transferencia de electrones de ubiquinol a ferricitocromo c, que se acopla a la translocación de protones para la síntesis de ATP (210). Tanto los potenciales de membrana mitocondrial como las fuerzas motoras de protones potenciadas aumentan la formación de ROS (209,211), también se ha visto que las concentraciones de oxígeno, ya sean hiperóxicas o hipóxicas, pueden aumentar los niveles de ROS (212).

El retículo endoplasmático es una maquinaria plegadora de proteínas. Contiene unos sensores que identifican a las proteínas mal plegadas o desplegadas y también contiene chaperonas propiamente para plegar las proteínas. En el proceso de plegamiento pueden formarse ROS. Diversas situaciones pueden llevar a producir una alteración en la homeostasia como son cambios en el Calcio intraluminal, glicosilación alterada, privación de nutrientes, infección de patógenos, expresión de proteínas defectuosas de plegamiento y cambios en el estado redox. Cuando se produce dicha alteración homeostática se produce el plegamiento incorrecto de las proteínas. En este momento se produce la respuesta de la proteína desplegada que es una vía de

señalización intracelular que coordina la demanda de plegamiento de proteínas y es esencial para adaptarse a las alteraciones homeostáticas.

Se ha evidenciado que en el retículo endoplasmático se forman ROS como subproducto de la oxidación de proteínas relacionado con el plegamiento de proteínas. También se ha visto que la activación de la respuesta de la proteína plegada ante la respuesta del estrés oxidativo es un mecanismo adaptativo para preservar la función y supervivencia de las células (213). Si el estrés oxidativo persiste, el mal plegamiento de las proteínas iniciará la cascada apoptótica. Las proteínas disulfuroisomerasa y oxidoreductina del retículo endoplasmático son dos enzimas responsables de regular el plegamiento de proteína oxidada en el retículo endoplasmático. La formación de enlaces disulfuro es conducida por un relevo de proteínas que implica a la enzima disulfuroisomerasa. La disulfuroisomerasa tiene funciones enzimáticas que facilitan el plegamiento correcto de proteínas en el retículo endoplasmático, y su actividad isomerasa cataliza la transposición de enlaces disulfuro formados incorrectamente y la actividad oxidasa introduce disulfuros en proteínas (214). Como consecuencia de estos procesos mediados por el retículo endoplasmático, las ROS también surgen cuando el GSH reduce los enlaces disulfuro inestables e inadecuados y, por lo tanto, se agota (213). La respuesta de la proteína desplegada provoca la fuga de Calcio del retículo endoplasmático al citosol, desencadenando posteriormente la producción de ROS en las mitocondrias (215). El plegamiento y replegamiento de proteínas son procesos dependientes de ATP y el agotamiento inducido por ATP puede estimular la fosforilación oxidativa mitocondrial para aumentar la generación de ATP, lo que finalmente forma ROS (213).

El complejo NADPH oxidasa es un complejo enzimático que contiene múltiples subunidades y contiene sitios de unión a FAD y a NADPH. Su función principal es contribuir a la distribución tisular y la localización subcelular. Cuando se activa el NADPH citosólico, transfiere sus electrones al FAD que finalmente termina en la molécula de oxígeno formando el anión superóxido. Una amplia gama de enzimas, incluyendo xantina oxidasa, lipoxigenasa, ciclooxigenasa, oxigenasa dependiente de NADPH y óxido nítrico sintasas, también pueden producir ROS y RNS.

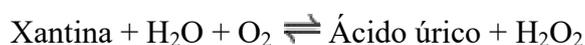
1.2.3. Evidencia del estrés oxidativo en paciente crítico con sepsis.

La sepsis tiene efectos profundos en todos los aspectos de la fisiología del oxígeno, desde su transporte en hematíes y su distribución a través de la microcirculación hasta su utilización máxima en las mitocondrias para producir energía en forma de ATP. Numerosos estudios han demostrado la prevalencia del daño oxidativo por el desequilibrio redox que se produce en la sepsis; bien sea por un exceso de los ROS o por un defecto en los antioxidantes (204).

1.2.3.1. Fuentes de Especies Reactivas de Oxígeno en sepsis.

En los procesos sépticos existen varias fuentes potenciales de formación de ROS, incluyendo la cadena respiratoria de transporte de electrones, la activación de la xantina oxidasa provocada por la isquemia y reperfusión, el aumento de la actividad de la cadena respiratoria asociada a la activación de los neutrófilos y al metabolismo del ácido araquidónico. La isquemia de los tejidos en un paciente séptico puede producirse por la suma de diversos factores como el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos que están circulando por la sangre periférica, por el consumo de oxígeno de la cadena respiratoria de los neutrófilos para aumentar sus agentes citotóxicos y por las alteraciones en la coagulación. De manera fisiológica se produce un 2% de estas ROS, que fácilmente es neutralizado por las defensas antioxidantes, por una reducción del oxígeno incompleta (216).

Como consecuencia de la isquemia, los nucleótidos de adenina son metabolizados a hipoxantina, el sustrato de la xantino oxidasa. Además, la isquemia induce la conversión de la xantina deshidrogenasa a xantino oxidasa, con la consiguiente formación de superóxido y peróxido de hidrógeno. Cuando se agota la vía de la SOD el superóxido se acumula porque no pasa a peróxido de hidrógeno. La xantina oxidasa cataliza las siguientes reacciones químicas:



La enzima xantino oxidasa cataliza la formación de ácido úrico con la coproducción de superóxido. La liberación de superóxido produce el reclutamiento y la activación de neutrófilos que se adhieren a las células endoteliales estimulando la formación de xantino oxidasa en el endotelio y contribuyendo a la mayor producción de superóxido. Como consecuencia de la repercusión posterior a la isquemia, se produce un estado de hiperoxia que provoca la producción de más radical superóxido. Estos radicales libres generados contribuye a una peroxidación lipídica de membrana, formación de metabolitos de ácido araquidónico y a una alteración de la microvasculatura corporal (217).

En la sepsis se produce una activación de los neutrófilos. Éstos producen superóxido como un agente citotóxico, a partir de la explosión respiratoria tras la acción de la NADPH unida a la membrana en oxígeno molecular. Los neutrófilos también producen el radical libre óxido nítrico, que puede reaccionar con superóxido para formar peroxinitrito, que es un poderoso oxidante capaz de descomponerse y formar el radical hidroxilo (218).

1.2.3.2. Respuesta inmune en la sepsis.

Recientemente se han publicado datos que indican que el sistema inmune en el proceso de la sepsis en realidad muestra dos fases: una primera fase inicial en la que se produce una hiperinflamación seguida de otra más prolongada (219).

La infección induce la respuesta del huésped donde se activan tanto elementos humorales (complemento, proteínas de fase aguda y citocinas) como elementos celulares (monocitos, macrófagos y mediadores inflamatorios). En la sepsis, se produce una infiltración en el tejido por los fagocitos. Los leucocitos polimorfonucleares y monocitos/macrófagos que responden a la estimulación séptica producen ROS (por ejemplo, superóxido, peróxido de hidrógeno) y especies RNS (por ejemplo, óxido nítrico) (220). Por lo tanto, los radicales libres producidos en exceso amplifican la respuesta inflamatoria que ocurre en la sepsis. Estos radicales actúan como mensajeros de la señal celular, alterando la expresión de la inmunomodulación inflamatoria (221) y

produciendo daño celular (membrana, proteínas y ADN), que generalmente conduce a la disfunción celular, fallomultiorgánico y muerte eventual del paciente.

Existe controversia respecto al uso de antiinflamatorios en estos pacientes. Hay estudios que indican que la muerte por sepsis fue atribuible a un sistema inmunitario sobreestimulado, pero estos estudios están hechos en animales, no obstante, no parecen reflejar el cuadro clínico en humanos (219).

Los biomarcadores de inflamación son parámetros útiles en el diagnóstico de infecciones en las áreas de emergencias (222). Un biomarcador muy estudiado en enfermedades inflamatorias es la interleucina 6 (IL-6). La IL-6 es una glicoproteína involucrada en la inflamación cuya liberación es inducida por la interleucina 1 (IL-1). La IL-6 es secretada por los macrófagos, las células T, las células endoteliales y los fibroblastos. La concentración sérica de IL-6 normal se encuentra por debajo de 5 pg/mL y se ha visto que aumenta tras 1 hora y alcanza un máximo tras 2 horas después del estímulo infeccioso (223). Se ha observado que los niveles de IL-6 están asociados con la mortalidad cardiovascular y otras causas en general en la población anciana (224). La IL-6 se encuentra elevada también en varias enfermedades asociadas con procesos inflamatorios tal como sepsis, neoplasias, enfermedades autoinmunes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedad hepática alcohólica e infecciones o rechazo de transplantes (225–229).

1.2.3.3. Daño celular en la sepsis.

En condiciones normales del metabolismo aeróbico, las ROS se forman a unos niveles muy bajos, y el daño que causan a las células es reparado constantemente. Sin embargo, en el estado de sepsis, estas ROS producen una oxidación del ADN y de las proteínas, y un daño en la membrana celular por la peroxidación lipídica, conduciendo a la alteración de la permeabilidad de la membrana, alteración en la estructura de las proteínas y cambios en su función. Además se produce un daño en la membrana mitocondrial, lo que provoca una despolarización y un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Este daño mitocondrial provoca una liberación del citocromo c, una activación de las caspasas y una muerte celular programada. Bajo los graves niveles de estrés oxidativo, el daño celular produce agotamiento de ATP impidiendo la muerte

celular por apoptosis controlada, provocando que la célula muera liberando al medio numerosos compuestos citotóxicos (230,231).

En un estudio realizado por Bavunoglu et al. (232), se hizo una asociación de mediadores inflamatorios (neopterina plasmática, adenosina desaminasa (ADA), molécula de adhesión celular vascular (VCAM), molécula de adhesión intracelular (ICAM), IL-1, IL-6 y el TNF- α con el estrés oxidativo (niveles de óxido nítrico sérico (NOx), nitrotirosina (NT), LDL oxidado, actividad de paraoxonasa 1 sérica (PON1) y niveles de GSH eritrocítico con la gravedad en pacientes sépticos. Se evaluaron 12 pacientes con sepsis leve, 25 pacientes con sepsis grave y 20 pacientes sanos control. En sus resultados se correlacionaron con la gravedad de la sepsis los niveles séricos de IL-6, TNF- α , NT y LDL oxidado. Por tanto, los aumentos en estos parámetros pueden contribuir a la disfunción o fallo de uno o más órganos, o incluso la muerte, en la sepsis. Todos los parámetros en la sepsis leve y severa fueron significativamente diferentes de los sujetos sanos, excepto en las actividades de ADA. Con respecto a la GSH (98%, 98%), LDL oxidado (98%, 98%), VCAM-1 (99%, 99%) e ICAM-1 (99%, 99%) se observó que tienen mucha más sensibilidad y especificidad en la sepsis.

En la sepsis se producen una amplia gama de efectos sobre los hematíes. Algunos efectos como el metabolismo alterado y la disminución de la 2,3-bifosfoglicerato son previsibles con un tratamiento apropiado, mientras que otros como la disminución de la deformabilidad de los eritrocitos y la redistribución de los fosfolípidos de membrana, parecen ser permanentes (233).

En la sepsis se producen cambios en el volumen de los hematíes, el metabolismo y la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, en la morfología y en la deformabilidad de los hematíes (un indicador temprano de sepsis), en el estado antioxidante, en la homeostasis de Ca²⁺ intracelular, en las proteínas de membrana, en los fosfolípido de membrana, en la redistribución, depuración y eflujo de ATP dependiente de O₂ de los hematíes (233).

Los hematíes en los pacientes con sepsis se encuentran en una circulación disfuncional con una exposición a ROS exógenas y endógenas, utilizadas por el cuerpo para combatir las infecciones o generadas por la hemoglobina, y maximizadas en condiciones de hipoxia.

La desregulación que se produce es particularmente evidente en las células, los orgánulos y en los sistemas que generalmente están implicados en la administración y el consumo de oxígeno, o más específicamente, los eritrocitos, las mitocondrias (234) y la microcirculación (235).

En una población de pacientes sépticos caracterizada por disminución del hematocrito (HCT), hemoglobina (Hb) y recuento de hematíes, pero sin cambios en el volumen corpuscular medio (VCM) en las primeras 24 horas de la sepsis, Piagnerelli et al. (236) observaron que los hematíes eran más esféricos en pacientes sépticos en comparación con voluntarios sanos. La esfericidad se basó en la dispersión de luz directa y se encontró que se correlaciona con el contenido de la membrana de ácido siálico de los hematíes.

Kim et al (237) realizaron un estudio prospectivo en el que los pacientes con sepsis y *shock* séptico se estratificaron según la amplitud de la distribución eritrocitaria (ADE) basal (en el momento del ingreso al servicio de urgencias) y con los cambios en el ADE entre el valor inicial y a las 72 h. Mostraron que la ADE desde el inicio se asoció con una mayor mortalidad de 28 y 90 días en pacientes con *shock* séptico. Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos que afectan el ADE son desconocidos y existe cierta incertidumbre con respecto a la importancia del parámetro ADE, ya que algunos estudios no detectaron diferencias entre los pacientes sépticos y el grupo control.

La rigidez de los eritrocitos o la disminución de la deformabilidad que se produce en los eritrocitos en la sepsis se asocia con un aumento de la disfunción orgánica y un peor pronóstico para el paciente (238).

En condiciones fisiológicas normales, el aumento de la acidez disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (efecto Bohr), desplazando la curva de disociación de oxígeno (CDO) hacia la derecha, aumentando la P_{50} y promoviendo la liberación de oxígeno. Esto es ventajoso en los tejidos que respiran activamente, ya que el dióxido de carbono (CO_2) producido puede difundirse en el glóbulo rojo donde puede unirse a la hemoglobina o reaccionar con agua y ser interconvertido por anhidrasa carbónica a ion hidrógeno (H^+) y bicarbonato (HCO_3^-). Sin embargo, en la sepsis, la evidencia sugiere que la curva CDO de los hematíes se desplaza hacia la izquierda, disminuyendo la P_{50} y aumentando la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno.

El 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) es un regulador alostérico de la Hb que se une a la cavidad central de la molécula de Hb y disminuye la afinidad de la Hb por el oxígeno en un factor de 26. Está presente en altas concentraciones bajo fisiología normal y es sintetizado por el hematíes en condiciones hipóxicas, cambiando así la CDO a la derecha, aumentando la P_{50} y promoviendo la liberación de oxígeno. Sin embargo, persiste cierta incertidumbre en cuanto al efecto de la sepsis sobre los niveles de 2,3-BPG de los hematíes.

En pacientes críticamente enfermos y sépticos, la acidemia, la hipofosfatemia y la transfusión de sangre con 2,3-BPG son factores que pueden cambiar la CDO hacia la izquierda, disminuir la P_{50} , aumentar la afinidad de la Hb por el oxígeno y disminuir la liberación de oxígeno. Numerosos estudios clínicos han observado niveles disminuidos de 2,3-BPG de los hematíes y P_{50} reducida, en pacientes con enfermedad crítica y sepsis (239,240). Por otro lado, Ibrahim et al. (235) observaron en su estudio que no había diferencia en los niveles de 2,3-BPG entre los supervivientes y los no supervivientes de la UCI (239). Se requiere una investigación adicional para obtener una comprensión más completa de los cambios inducidos por la sepsis en la curva CDO de los GR y el efecto sobre la liberación del oxígeno de las redes capilares a los tejidos hipóxicos.

Los antioxidantes protegen a las células de los efectos dañinos de los radicales libres y las ROS (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo). Estos radicales causan daño oxidativo a las membranas (peroxidación lipídica), a las proteínas (desnaturalizan y oxidan residuos de aminoácidos y grupos tiol) y al ADN (introduciendo rupturas de cadena) que da como resultado un daño celular y de orgánulos, y una función celular alterada. Este daño es especialmente cuantioso si las defensas antioxidantes endógenas se agotan debido a una infección o una sepsis (189,241–243).

En el paciente crítico incurren altos niveles de estrés oxidativo y comúnmente se presentan con deficiencia de Vit D. En un estudio de Alvarez et al. (244), se investiga la relación entre el estado de la Vit D y los marcadores plasmáticos de GSH y cisteína e inmunidad en niños críticamente enfermos. Este fue un estudio transversal de 50 pacientes que se encontraban en la UCI pediátrica. Los sujetos fueron categorizados de acuerdo a sus concentraciones plasmáticas de 25-hidroxivitamina D: (<20 , $20-30$ y ≥ 30 ng/dL). Los resultados mostraron que la cisteína disminuye en sujetos con

concentraciones plasmáticas de Vit D \geq 30 ng/mL en comparación con aquellos con concentraciones de Vit D $<$ 20 ng/mL. El GSH plasmático total disminuyó al aumentar la categoría Vit D, y los niveles plasmáticos de glutamina fueron más bajos en sujetos con concentraciones plasmáticas de Vit D \geq 30 ng/mL.

Marik et al. (189) realizaron un estudio de pacientes sépticos que se encuentran en la UCI a los cuales se le administra vitamina C, hidrocortisona y tiamina durante 7 meses y se comparan con un grupo control. Al cabo de los 7 meses se observó una menor mortalidad y disfunción orgánica en los pacientes tratados con vitamina C, hidrocortisona y tiamina. Se sabe que la vitamina C inhibe la apoptosis celular y, también inhibe la apoptosis de los eritrocitos (245). Del mismo modo, se descubrió que la vitamina E (un antioxidante de pequeño tamaño molecular) mejora el resultado del paciente séptico y mejorar la deformabilidad de hematíes (246).

En un estudio realizado por Goode et al. (241) se observó que los pacientes con *shock* séptico tenían niveles plasmáticos disminuidos de retinol (vitamina A), alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno y licopeno (indicativo de una disminución del potencial antioxidante de molécula pequeña), y una mayor evidencia de peroxidación lipídica en los pacientes que sufrían insuficiencia orgánica.

Rattan et al. (247) estudiaron el perfil plasmático de pacientes sépticos con insuficiencia renal aguda. Estos pacientes presentaron un aumento de malondialdehído (MDA) (indicativo de aumento de la peroxidación lipídica), una disminución del ácido ascórbico y del alfa-tocoferol (indicativo de un menor potencial antioxidante de molécula pequeña), así como un aumento de la catalasa plasmática (indicativo de una conversión plasmática aumentada de anión superóxido a peróxido de hidrógeno) y una disminución del GSH en los hematíes (indicativo de un potencial reducido para reciclar antioxidantes oxidados y proteger a los grupos tiol de proteínas para que no se oxiden).

De manera similar, en pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda monitorizados durante seis días, Metnitz et al. (248) informaron que el sistema antioxidante estaba "severamente comprometido". En plasma, encontraron niveles elevados de MDA y niveles reducidos de ascorbato, alfa-tocoferol, beta-caroteno y Se. La producción de neutrófilos de anión superóxido y peróxido de hidrógeno disminuyó con el tiempo, pero no se observaron cambios en los antioxidantes que detoxifican dichos radicales (SOD, catalasa o GPx).

Por otro lado, se realizó un estudio donde se midió la reacción de radicales peroxilo con antioxidantes como medio para evaluar la capacidad antioxidante, basado en el poder de captación de radicales totales (TRAP). Se vio que la capacidad antioxidante disminuía en pacientes con sepsis dentro de las 24 horas del diagnóstico. Sin embargo, de forma paradójica se vio que la señal de TRAP aumentó en los pacientes con *shock* séptico no supervivientes durante un período de 8 días. Sin embargo, la señal de TRAP aumentada se debió en gran parte a un aumento en la bilirrubina, el producto final de la degradación del hemo, y al ácido úrico. En consecuencia, y de importancia potencial en estos pacientes con *shock* séptico es que la oxidación de la Hb puede haber iniciado la degradación del hemo, lo que sugiere que el aumento de la señal TRAP en los pacientes con *shock* séptico no supervivientes puede haber llegado a expensas de la oxidación de los hematíes (249).

Además, en un estudio donde se midió la capacidad antioxidante total (CAT) del plasma, no se encontraron diferencias en los niveles de CAT entre sujetos sanos y pacientes con sepsis grave o *shock* séptico (pacientes reclutados dentro de las 18 horas de aparición de síntomas sépticos). Sin embargo, los antioxidantes de molécula pequeña alfa-tocoferol (relación vitamina E/lípidos), retinol y ascorbato, se redujeron significativamente en ambos grupos de sepsis en comparación con el control (243).

Las citoquinas proinflamatorias inducidas por sepsis (TNF- α , IL-1 y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)), activaron el ensamblaje de NADPH oxidasa en la membrana celular externa y desencadenaron el "estallido respiratorio" posterior, generando poderosas ROS que se utilizan para destruir las bacterias engullidas (250). La NADPH oxidasa genera el anión superóxido de radicales libres de oxígeno, a partir del oxígeno y la NADPH. El superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno por la SOD y se utiliza en combinación con otros oxidantes para matar bacterias, pero si escapa del neutrófilo puede dañar el tejido adyacente y los hematíes (251).

Oliveira et al. (252) encontró que la sepsis conduce a un alto estrés oxidativo, no solo por la aparición de eritrocitos modificados oxidativamente, si no por la activación de leucocitos circulantes por estos eritrocitos modificados. Oliveira propone una retroalimentación positiva que mantendría el estado prooxidativo incluso después de la desaparición de las bacterias. Otro estudio (253), se estudió la xantino oxidasa (XO) y la

formación de carbonilos proteicos (marcador de oxidación proteica) en pacientes con sepsis. Se observó que la XO tenía valores superiores en los no supervivientes de sepsis y mayor formación de carbonilos proteicos en los pacientes sépticos en comparación con controles sanos. Sin embargo, a las 72 horas no hubo diferencia en la actividad de XO en plasma entre supervivientes y no supervivientes. Sin embargo, la evidencia de peroxidación lipídica en plasma y daño oxidativo fue mayor en personas sépticas no supervivientes, lo que sugiere que los no supervivientes habrían experimentado mayores niveles de estrés oxidativo, como lo hubieran hecho sus eritrocitos circulantes o tendrían niveles más bajos de defensas antioxidantes.

Los eritrocitos, en condiciones normales, están continuamente expuestos alperóxido de hidrógeno endógeno (autooxidación) y expuestos agudamente alperóxido de hidrógeno exógeno bajo condiciones sépticas (neutrófilos/fagocitos, células endoteliales y plasma). Por lo tanto, los eritrocitos dependen de mecanismos antioxidantes para sobrevivir al estrés oxidativo y seguir siendo viable en condiciones sépticas.

Karpetsaet al. (254), encontraron que en la admisión, los pacientes sépticos tenían incrementada la actividad de la catalasa eritrocitaria y disminuida la proteína oxidada eritrocitaria (medida por el nivel de carbonilo) en los supervivientes de sepsis con respecto a los no supervivientes. Sin embargo, no se observaron diferencias en el GSH eritrocitario. El nivel de carbonilo en plasma (indicador de oxidación de proteína) fue elevado en no supervivientes. Todo esto sugiere que se había producido una mayor oxidación de proteína tanto en el plasma como en el eritrocito en el momento del diagnóstico de sepsis. Además, Guerreiro et al. (255), informaron que la SOD y los carbonilos en plasma se incrementaban en pacientes no supervivientes de sepsis, y que una disminución en la SOD en plasma se asociaba con mejores resultados en estos pacientes. Sin embargo, no encontraron diferencias en el nivel de catalasa plasmática o de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (un marcador general de estrés oxidativo) entre los supervivientes y los no supervivientes.

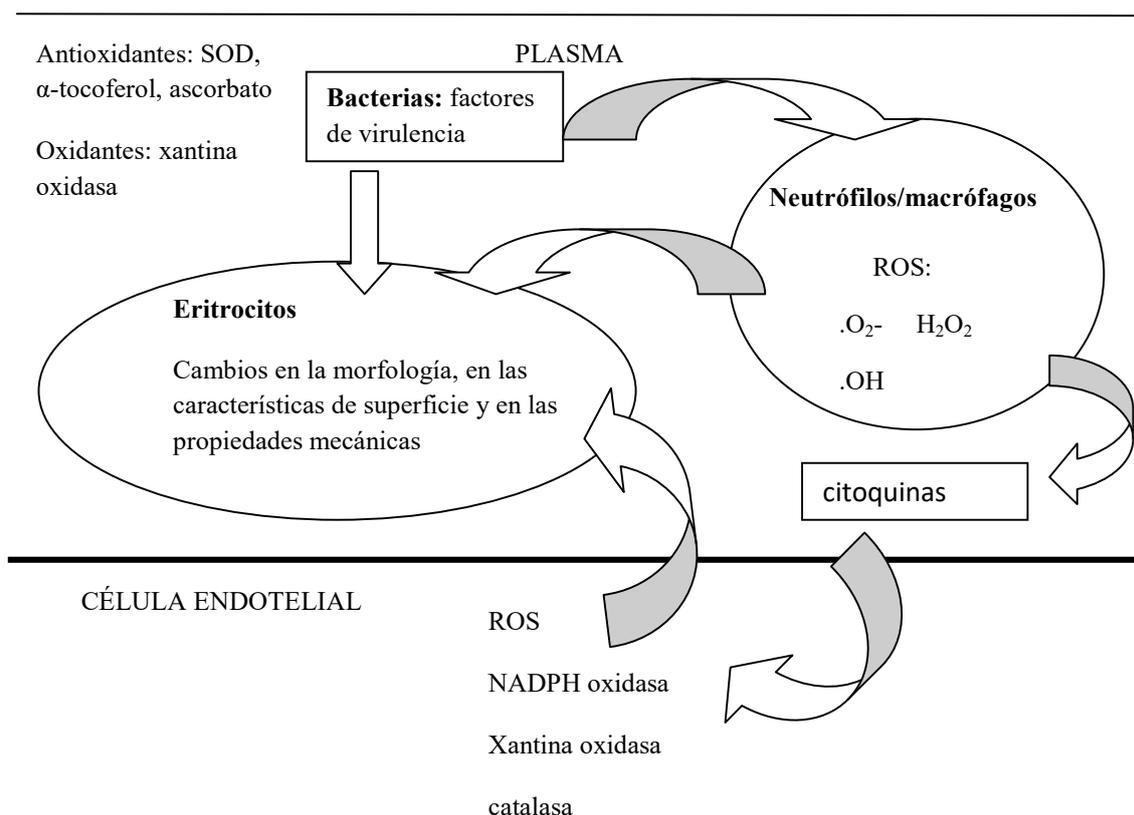
En un estudio anterior (256), se obtuvieron resultados que concuerdan con los anteriores, observándose un aumento de la SOD y catalasa en plasma y en eritrocito en pacientes sépticos en el momento del diagnóstico con respecto a controles sanos. Por otro lado, la SOD y la catalasa plasmáticas se encontraron elevados en los pacientes no

supervivientes con respecto a los supervivientes. Sin embargo, no se observaron diferencias de la catalasa y SOD en eritrocito entre supervivientes y no supervivientes.

Entendiendo el proceso séptico en conjunto, en la sepsis se ven inducidos múltiples fuentes de ROS (neutrófilos, células endoteliales, eritrocitos y plasma) y se asocian con una disminución del estado antioxidante. Varios estudios han relacionado a los ROS de leucocitos (neutrófilos) con propiedades eritrocíticas alteradas. Sin embargo, se requieren estudios de sepsis más definitivos para determinar cómo se altera el sistema antioxidante general en el eritrocito durante el estrés oxidativo inducido por la sepsis.

La **Figura 1** donde se observa un esquema de exposición de eritrocitos a fuentes exógenas de ROS.

Figura 1. Fuentes de exposición de los eritrocitos a las especies reactivas del oxígeno (ROS).



El esquema representa interacciones entre factores de virulencia bacteriana con eritrocitos y fagocitos. Los fagocitos generan y liberan ROS que activan las células endoteliales, exponiendo a los eritrocitos a fuentes exógenas de ROS. El plasma contiene enzimas generadoras de oxidantes y varios antioxidantes que actúan para eliminar ROS. Además de la exposición de ROS exógenas, el eritrocito también está expuesto a fuentes endógenas de ROS a través de la autooxidación de la Hb. SOD: Superóxidodismutasa. O_2^- : anión superóxido. H_2O_2 : peróxido de hidrógeno. $\cdot OH$: radical hidroxilo.

En el eritrocito se encuentra muy regulada la concentración de Ca. Ésta es mantenida por una bomba de ATPasa de Ca en la membrana plasmática que mantiene sugradiente 1.8 mM en plasma frente a una concentración de 30-60 nM en el citoplasma del eritrocito. El Ca intracelular del eritrocito tiene funciones importantes: modula la distribución de la fosfatidilserina en la membrana (una señal asociada con la eliminación de los eritrocitos), proteólisis (activación de calpaína), actividad transglutaminasa, morfología del eritrocito, volumen celular, reología y adhesión (257).

En un proceso séptico o en presencia de endotoxemia se altera el calcio intracelular. En un estudio clínico (258), estudiaron el calcio plasmático en individuos con sepsis donde encontraron una correlación de la sepsis con la hipocalcemia, observando que los pacientes no supervivientes tenían una mayor hipocalcemia que los pacientes supervivientes. De la misma manera, en otro estudio estudio (259), se observa que los niveles de calcio intracelular aumentan en el eritrocito en los pacientes con sepsis. En este mismo estudio, se reproducen los hallazgos clínicos in vitro, donde se incubaba la sangre con la endotoxina de E. Coli y se observa que el aumento de calcio intracelular no se inhibe con verapamilo pero sí con pretratamiento con ATP, lo que sugiere que una deficiencia de energía fue la responsable de un aumento de Ca intracelular. Un estudio más reciente (260), que consiste en la incubación de sangre de pacientes sanos con Lípido A (región más interna del lipopolisacárido de la endotoxina), concluyen que los niveles de calcio citosólico aumentan en estas células y además disminuye la deformabilidad del eritrocito (aumenta su rigidez). Además, Lau et al. (261) se informó que la actividad de la bomba de Ca^{2+} del eritrocito (Velocidad máxima) disminuye en pacientes sépticos.

En una revisión de Dare et al. (262), se definieron cinco categorías de terapias mitocondriales: suministro de sustrato, provisión de cofactores, antioxidantes mitocondriales, capturadores de especies de oxígeno reactivo mitocondrial y estabilizadores de membrana. Las terapias mitocondriales en estos pacientes se asociaron con mejoras en la función del sistema de transporte de electrones mitocondrial, con la fosforilación oxidativa y con la producción de ATP, así como con una reducción en los marcadores celulares del estrés oxidativo. Se observó también la mejoría de las citocinas proinflamatorias, la activación de caspasas y la prevención de la transición de permeabilidad de la membrana. Además, la restauración de la

bioenergética mitocondrial se asoció con mejoras en los parámetros hemodinámicos, la función de los órganos y la supervivencia general.

En un estudio de Brealey et al. (263), quedó demostrado que existe una asociación entre la mortalidad en los pacientes sépticos y la disfunción mitocondrial, entendida esta última como una disminución significativa en el nivel de ATP. En otro estudio de Fredriksson et al. (264), se observa en pacientes con condiciones sépticas prolongadas una disminución en el número de mitocondrias, lo que implica que la disfunción relacionada con la sepsis de las mitocondrias puede provocar mitoptosis. Un sistema inmune activado junto con mitocondrias disfuncionales representan las dos fuentes más potentes de especies moleculares reactivas del organismo. De forma reiterada y pertinente, se ha documentado que la sepsis se caracteriza por una producción excesiva de ROS y RNS, tanto en la circulación (por células del sistema inmune activadas y células endoteliales) como en los órganos afectados (por mitocondrias disfuncionales y debido a un estado anti-oxidativo modificado). Las ROS y RNS desempeñan un papel crucial en la fisiopatología de la sepsis, quedan representadas en la **Tabla 5** (265).

Tabla 5. Principales especies reactivas implicadas en la patogénesis de la sepsis.

Radicales Libres	No radicales libres
Especies reactivas de oxígeno	Especies reactivas de oxígeno
<ul style="list-style-type: none"> • Anión superóxido. $\cdot\text{O}_2^-$ • Radical hidroxilo. $\cdot\text{OH}$ • Radical hidroperóxido. $\cdot\text{OOH}$ • Radical peróxido. $\cdot\text{ROO}$ 	<ul style="list-style-type: none"> • Peróxido de hidrógeno. H_2O_2 • Ácido hipocloroso. HClO
Especies reactivas de nitrógeno	Especies reactivas de nitrógeno
<ul style="list-style-type: none"> • Óxido nítrico. $\cdot\text{NO}$ • Radical dióxido de nitrógeno. $\cdot\text{NO}_2$ 	<ul style="list-style-type: none"> • Peroxinitrito. ONOO^- • Ácido peroxinitroso. ONOOH

El paciente con *shock* séptico cursa con unos niveles muy elevados de lactato que puede ser debido a diferentes mecanismos. Primero al desequilibrio producido entre la demanda de oxígeno por parte de los tejidos y el suministro sanguíneo de éste, en el que se da una alteración en la extracción del oxígeno de los tejidos debido a una microcirculación anormal inducida por la sepsis y también hay una disfunción mitocondrial que conduce a la activación del metabolismo anaeróbico donde el piruvato se desplaza a la producción de lactato (266). Otro mecanismo no hipóxico está

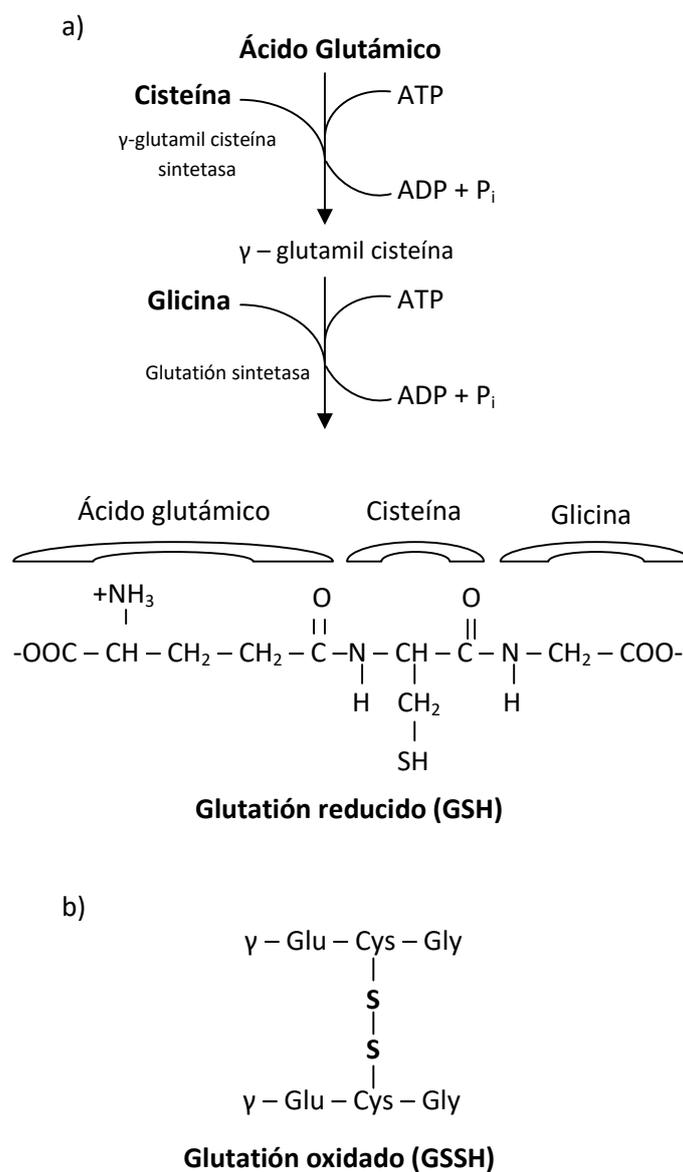
relacionado con la aceleración de la glucólisis aeróbica inducida por la inflamación producida en la sepsis (266), que se puede producir en el músculo esquelético a través de la estimulación de la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ (267), inhibición del complejo piruvato deshidrogenasa (268) y que puede ser una fuente principal de formación de lactato. También se ha visto que los pacientes con mayor lactacidemia tienen un menor aclaramiento de lactato, por lo tanto su eliminación se encuentra alterada (269). La deficiencia de tiamina también puede contribuir al aumento de lactato (156).

1.3. Glutación y ciclo gamma-glutamil.

1.3.1. Glutación.

1.3.1.1. Metabolismo del glutatión.

El GSH o L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina es un tripeptido hidrosoluble formado por tres aminoácidos que se encuentran en el citoplasma de las células (ácido glutámico (Glu), cisteína y glicina). Contiene un enlace peptídico entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del Glu. Durante la síntesis, el transporte y el catabolismo del GSH se producen en una serie de pasos enzimáticos y transportes de membrana que colectivamente se denominan ciclo γ -glutamil (270). La síntesis del GSH se da en el citosol. Una molécula de ATP activa el grupo γ -carboxilo del Glu y forma un intermediario acil fosfato, que seguidamente, es atacado por el grupo α -amino de la cisteína formando γ -glutamil cisteína. Después, se produce una segunda reacción de condensación, otra molécula de ATP activa el grupo α -carboxilo de la cisteína formando un intermediario acil fosfato que permite la reacción con la glicina, formándose el GSH. Esta biosíntesis se puede observar en la **Figura 2.**

Figura 2. Estructura química de las formas del glutatión.

a) Biosíntesis del glutatión. Glutatión reducido (GSH), su grupo activo es el grupo SH del residuo de Cisteína. b) Glutatión oxidado (GSSH), formado por dos moléculas de GSH unidas por un enlace disulfuro. *Adaptación de Lehninger. Principios de Bioquímica (271).*

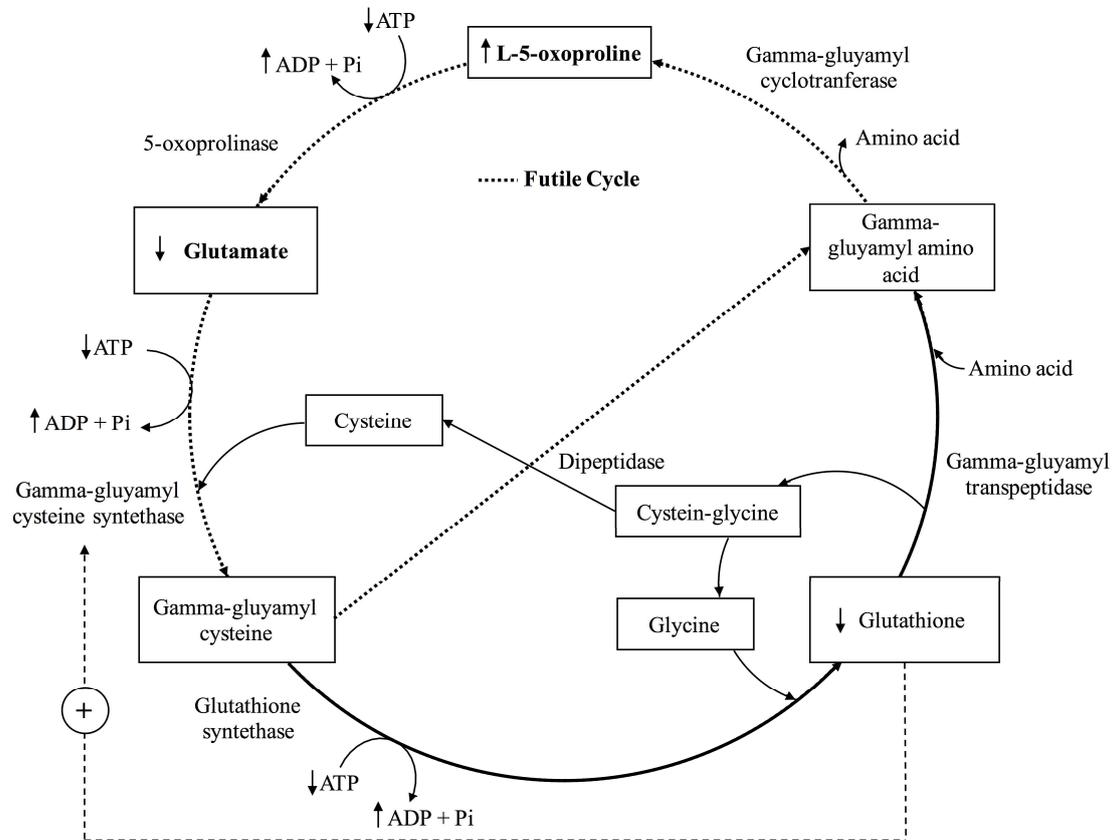
Aunque la síntesis del GSH es citoplasmática, esta molécula se encuentra presente en todos los orgánulos de la célula, incluido el núcleo (272), y en todos los órganos y tejidos, especialmente en el hígado, tanto en su forma libre como unida a proteínas. El glutatión oxidado (GSSH), producido en el transcurso de sus actividades redox, es la forma oxidada, que contiene dos moléculas de GSH unidas mediante un puente disulfuro y la forma extracelular de la molécula.

La GSH es la forma tiol reducida, la forma intracelular, la forma activa de la molécula y la más abundante (**Figura 2**). Más de un 90% del total del GSH se encuentra en forma reducida (GSH) y menos de un 10 % se encuentra en la forma disulfuro (GSSG). La relación molar GSH/GSSH es un indicador de la funcionalidad celular y su alteración está relacionada con varios procesos patológicos. Un incremento en el ratio entre GSSG y GSH es un indicador de estrés oxidativo.

La biosíntesis del GSH por la vía del ciclo gamma-glutamil es importante para el mantenimiento de la homeostasis del GSH y el estado redox (**Figura 3**). La función de este ciclo propuesto por Meister (273), es la de transferir un aminoácido y finalmente completar la síntesis de GSH (274).

La tasa de formación del GSH depende de dos factores: uno de ellos es la actividad de la gamma-glutamil cisteína sintetasa y el otro es la disponibilidad del sustrato de la cisteína. Por un lado, el producto final de la reacción, el GSH, cuando se encuentra en exceso, inhibe a la enzima gamma-glutamil cisteína sintetasa, por lo tanto, el GSH regula su propia síntesis por feed back negativo (275–279). Por otro lado, también influye en la regulación del GSH, la disponibilidad del aminoácido L-cisteína que interviene en la primera reacción de condensación (270,280,281).

Una vez sintetizado, el GSH es transportado a los compartimentos intracelulares como las mitocondrias y el retículo endoplasmático, pero la mayor parte se libera al espacio extracelular mediante transportadores de la membrana citoplasmática. La degradación del GSH se produce exclusivamente en el espacio extracelular y sólo en la superficie de las células que expresan la enzima gamma-glutamiltranspeptidasa (GGT). Ésta actúa sobre el GSH formando dos fracciones: la fracción gamma-glutamil y la fracción cisteinilglicina. La fracción gamma-glutamil es transferida a un aminoácido aceptor, formando gamma-glutamil-aminoácido. La fracción cisteinil-glicina puede ser desdoblada en el mismo espacio extracelular a cisteína y glicina. La cisteína vuelve a ser captada por la célula, y en función de las necesidades de ésta, puede ser utilizada para la síntesis de proteínas, pudiendo participar de nuevo en la formación de GSH, o degradarse a taurina y sulfato. El gamma-glutamil-aminoácido puede entrar de nuevo a la célula y ser metabolizado para liberar el aminoácido y 5-oxoprolina o ácido piroglutámico (PiroGlu), que luego puede ser convertido en Glu para ser usado en la síntesis del GSH de nuevo.

Figura 3. Ciclo gamma -glutamil.

La molécula de glutatión se descompone en el aminoácido gamma-glutamil a través de la gamma-glutamiltranspeptidasa. El aminoácido gamma-glutamil es convertido a ácido piroglutámico (PiroGlu) a través de la gamma-glutamilciclotransferasa. El PiroGlu es convertido a ácido glutámico (Glu) a través de la 5-oxoprolinasa. El Glu es convertido en gammaglutamilcisteína a través de la gamma-glutamilcisteinasintetasa. Finalmente, el glutatión es sintetizado por la glutatión sintetasa.

Los órganos que mayoritariamente están implicados en la síntesis y degradación del GSH son el hígado y los riñones, que también participan en su transporte inter-órgano. Los hepatocitos, además, son las únicas células que tienen la capacidad de convertir la metionina en cisteína a través de la vía de transulfuración (279,282). La síntesis del GSH del hígado depende de la velocidad de los sistemas de transporte del GSH a la bilis, plasma y mitocondria (279,282).

1.3.1.2. Funciones del glutatión.

La GSH es una molécula multifactorial que participa en varios procesos fundamentales para la supervivencia celular. Es el antioxidante celular más abundante que previene la oxidación de los grupos tiol ya sea directamente al reducir las especies reactivas o indirectamente a través de sistemas catalíticos tales como la GPx (283). Las funciones del GSH se deben a dos características de su molécula:

- a) La unión gamma-glutamil entre los aminoácidos Glu y cisteína, y el gamma-carboxilo del Glu, en lugar del enlace α -carboxílico que se encuentra en las proteínas. Este enlace permite que la molécula sea estable en el interior de la célula, ya que el tripéptido sólo puede ser degradado por la GGT extracelularmente.
- b) El grupo sulfidrilo de la molécula de cisteína que es altamente reactivo y facilita la participación del GSH en una gran variedad de funciones entre las que destaca el mantenimiento del balance redox intracelular.

Existe una relación interconvertible de las formas reducida y la oxidada de la molécula de GSH, que hace que sea el mayor determinante del estado redox de la célula. A éste balance redox contribuye tanto la concentración de GSH cómo la relación molar GSH/GSSH. Este equilibrio redox regula muchos procesos metabólicos intracelulares: actividad enzimática, el transporte celular, transducción de señales y la expresión génica mediada por la transcripción de factores entre los que destacan el activador de proteína, el factor nuclear kappa-b (NF κ -B) y el p53 (275,282). El GSH participa en el mantenimiento de los grupos sulfidrilo de las proteínas en su forma reducida y el hierro del grupo hemo en estado ferroso (Fe^{2+}).

- a) Función antioxidante.

La acción redox del GSH es utilizada para eliminar peróxidos tóxicos, que se forman de manera fisiológica durante el crecimiento y en el metabolismo en condiciones aeróbicas formando GSSH. Esta reacción ocurre por la acción de la enzima glutatión peroxidasa, esto puede ocurrir tanto en el citosol como en la mitocondria, y también por la enzima catalasa, que está ausente en la mitocondria. El GSSH formado es reducido para formar nuevamente GSH por acción de la enzima GSH reductasa usando NADPH, formando así un ciclo de óxido-reducción. Cuando la célula se

encuentra en condiciones de estrés oxidativo severo, la habilidad de ésta para reducir GSSH a GSH se encuentra superada, produciéndose una acumulación de GSSH. Este último, tiene que ser activamente transportado fuera de la célula para evitar un cambio en el equilibrio redox intracelular, o bien reaccionar con los sulfidrilos de las proteínas para formar disulfuros mixtos (276).

b) Detoxificación de xenobióticos.

La función hepática de detoxificación y eliminación de compuestos xenobióticos está relacionada con la alta concentración de GSH en este órgano (279). En concreto, el GSH se conjuga con sustratos electrofílicos o por reacciones enzimáticas mediadas por la enzima GSH-S-transferasa para facilitar su eliminación por orina o heces bajo la forma de derivados de ácidos mercaptúricos (277).

c) Transporte y almacenamiento de cisteína.

El almacenamiento de cisteína es otra de las funciones de GSH (277). El aminoácido cisteína es altamente inestable en el espacio extracelular sufriendo una rápida auto-oxidación a cistina. Este proceso produce radicales libres potencialmente tóxicos. El ciclo gamma-glutamil descrito previamente hace del GSH una continua fuente de cisteína para las células (271).

d) Regulación del crecimiento y muerte celular.

El GSH actúa manteniendo reducida la tioredoxina que es necesaria para la actividad de la enzima ribonucleótido-reductasa, modulando así la síntesis de ADN (276). Los niveles bajos de GSH están relacionados con el inicio del proceso de apoptosis, en concreto, el descenso de GSH mitocondrial provoca una disfunción mitocondrial que lleva a la muerte celular.

El GSH tiene un papel fundamental en la homeostasis celular, equilibrando el estado redox, protegiendo frente al estrés oxidativo provocado por endobióticos y xenobióticos potencialmente dañinos. Se ha observado una disminución de los niveles de GSH en sangre en determinadas patologías: la enfermedad de Parkinson, formación de cataratas, diabetes, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, artritis

reumatoide, SIDA, enfermedad hepática crónica por alcohol, síndrome de estrés respiratorio y distrofia muscular (271). Por otro lado, Morris et al. (284) describieron cómo el GSH trabaja para modular el comportamiento de muchas células, incluidas las células del sistema inmune, lo que aumenta la inmunidad innata y adaptativa, así como la protección contra infecciones microbianas, virales y parasitarias.

En otro estudio (285), se investigó la correlación de la glutatión reductasa (GR) plasmática con la relación glutatión reducido y glutatión oxidado (GSH/GSSH) eritrocitario y su asociación con la mortalidad. En pacientes con *shock* séptico, la disminución de la actividad plasmática de la GR a las 24 h se asoció de forma independiente con un aumento de la mortalidad a los 28 días (odds ratio, 0.828; intervalo de confianza del 95%, 0.690-0.992, $p = 0.041$). La actividad del GR plasmática se correlacionó con la actividad GR eritrocitaria ($r = 0.549$, $p < 0.001$) y con la relación GSH /GSSG eritrocitaria ($r = 0.367$, $p = 0.009$) a las 24 horas. Una disminución en la actividad GR plasmática se asoció con un aumento en la mortalidad de pacientes con *shock* séptico.

1.3.2. Componentes del ciclo gamma-glutamil.

1.3.2.1. Ácido piroglutámico o 5-oxoprolina.

El ácido (S)-2-oxotetrahidropirrol-5-carboxílico, comúnmente llamado ácido piroglutámico, también conocido como piroglutamato o 5-oxoprolina o ácido pídólico (PiroGlu), es un derivado de aminoácido natural, en el que el grupo amino libre del Glu se cicla por deshidratación de forma espontánea para formar una lactama. Es un componente del ciclo del GSH, ciclo gamma-glutamil, donde es convertido en Glu a través de la 5-oxoprolinasa. En general, es un derivado de aminoácido poco estudiado.

1.3.2.2. Glutamina.

La glutamina es un α -aminoácido que se utiliza en la biosíntesis de proteínas. Es un precursor y un producto final metabólico que se encuentra altamente concentrado en la sangre. Participa prácticamente en todas las funciones metabólicas centrales, en el

soporte de las defensas celulares contra el estrés oxidativo y como complemento del metabolismo de la glucosa en la producción de energía y macromoléculas.

Funciones de la glutamina.

La glutamina participa en la síntesis directa de proteínas, como precursor para la síntesis de Glu utilizando la glutaminasa, como precursor para la síntesis de asparagina utilizando la asparaginasintetasa (286), como una fuente de α -cetoglutarato, que se incluye en el ciclo del ácido tricarboxílico (por lo tanto, puede producir energía en células cancerosas en proliferación (287–289)), como fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos, como precursor del antioxidante GSH (290), como precursor para síntesis de pirimidina, como modulador positivo de la autofagia y también propuesto como un antiácido (291).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS) permiten una identificación y cuantificación muy fiable de metabolitos sanguíneos como la glutamina. Existen numerosos estudios de investigación que, utilizando compuestos estándares, han demostrado que en condiciones normales la molécula de glutamina no es estable. La glutamina se cicla espontáneamente formando PiroGlu con la pérdida de una molécula de amoníaco, y bajo condiciones extremas de acidez ($\text{pH} < 2$), alcalinidad ($\text{pH} > 13$) o alta temperatura (292,293), se convierte primero en Glu y después pasa a PiroGlu.

Recientes investigaciones (292,294), han demostrado que la ciclación de la glutamina en PiroGlu también se produce in situ en el análisis de MS cuando se utilizan métodos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) y que el error en el análisis puede tener una magnitud significativa de estos metabolitos si no se hace una cuantificación adecuada. Para evitar estos errores se ha propuesto realizar correcciones a concentraciones aparentes de glutamina y PiroGlu mediante la combinación de condiciones cromatográficas adecuadas, patrones isotópicos y voltaje fragmentador optimizado (294). En otro estudio reciente (295), se demuestra que la ciclación de glutamina a PiroGlu se produce después de la ultrafiltración o la precipitación de proteínas, con niveles de glutamina que disminuyen hasta en un 75 % y un aumento proporcional de los niveles de PiroGlu.

1.3.2.3. Ácido glutámico.

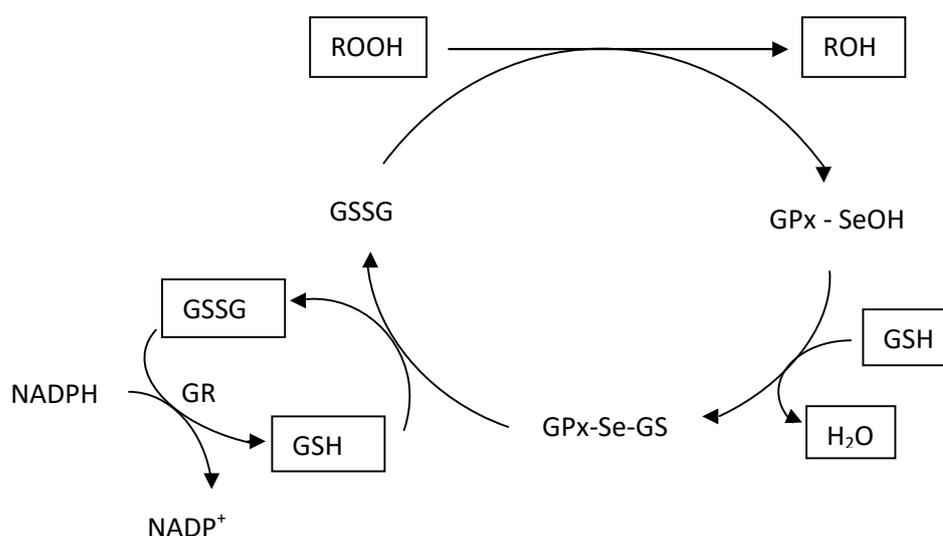
El Glu es uno de los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas, aunque no es esencial. Es clave para la función celular y es un neurotransmisor excitatorio. Participa en la síntesis de distintos aminoácidos que necesitan la formación previa de este ácido, como es el caso de la prolina, hidroxiprolina, ornitina y arginina, por lo que actúa como sustrato en la síntesis de proteínas. Regula el equilibrio ácido/básico en el riñón y la producción de urea en el hígado. Lo requieren las células del sistema inmune como fuente de energía. Es un precursor para la síntesis del GSH que es un metabolito con alto potencial antioxidante.

1.3.3. Glutación peroxidasa.

Las glutación peroxidases (GPxs) son una familia de enzimas homólogas a la selenocisteína (Sec). Están formadas por cuatro selenoproteínas diferentes: glutación peroxidasa citosólica (GPx1), fosfolípido hidroperóxido glutación peroxidasa (GPx2), glutación peroxidasa del plasma (Gpx3) y la forma gastrointestinal (GPx4). No todas las GPxs usan GSH, ni todos contienen Sec en el sitio activo. Más bien, algunas de estas enzimas se identifican funcionalmente como peroxidases dependientes de tiorredoxina que contienen una cisteína activa redox en lugar de la Sec. Una de las GPxs más abundantes es la GPx-1 de mamífero que usa glutación reducido (GSH) como cosustrato obligado en la reducción del peróxido de hidrógeno en agua. La GPx-1 incluye una enzima epitelial específica que se expresa altamente en el intestino (GPx-2), un subtipo secretado (GPx-3), y un subtipo que se expresa ampliamente y difiere en su especificidad de sustrato en comparación con los otros miembros de la familia (GPx-4). Por tanto, la GPx-1 es una enzima antioxidante crucial implicada en la prevención de la acumulación nociva de peróxido de hidrógeno intracelular. La GPx-1 está presente en todas las células. Se encuentra en compartimentos citosólicos, mitocondriales, en algunas células peroxisomales (296), y se ha encontrado que es más efectivo que la catalasa en la eliminación de peróxidos intracelulares bajo condiciones fisiológicas (297).

En la **Figura 4** se puede ver el mecanismo de reacción de la GPx y posterior acción de la glutatiónreductasa (GR). En primer lugar, el átomo de Se de la Sec que se encuentra en la GPx es el primer donador de electrones, cediéndoselos al peróxido. A continuación, los grupos sulfidrilo del GSH aportan sus electrones al Se y lo regenera la Sec pasando a su forma reducida, formándose GSSH. Posteriormente, la GR utiliza el NADPH como agente reductor quitándole sus electrones y aportándoselos al GSSH regenerándolo a GSH.

Figura 4.- Mecanismo de reacción de la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.



ROOH: peróxidos. ROH: alcoholes. GPx: glutatión peroxidasa. GSH: glutatión. GSSG: glutatión reducido. GR: glutatión reductasa.

La función principal de estas cuatro selenoproteínas es la de proteger a la célula frente a agresiones de oxidación por parte de los radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. Esta acción se produce a costa de la oxidación del GSH a GSSG. Se sabe que la GPx y la GR forman entre las dos un sistema antioxidante (GPx/GR) donde las dos enzimas son necesarias para mantener reducido al GSH a la vez que se neutralizan los peróxidos. Por otro lado, la SOD y la catalasa forman otro sistema antioxidante (SOD/CAT) que también se encarga de neutralizar a los peróxidos. El sistema SOD/CAT actúa a concentraciones altas de peróxidos y la GPx/GR actúa a concentraciones bajas de peróxidos. Por otro lado, se sabe que el TNF- α , la IL-1 y el interferon, son capaces de inhibir a la GPx.

1.3.4. Ciclo gamma-glutamil en paciente crítico.

La importancia del papel del PiroGlu en pacientes críticos no está bien documentado. La forma adquirida de acidosis metabólica por PiroGlu fue descrita por primera vez en 1989 (298). La detección de esta acidosis se identifica descartando el resto de acidosis posibles. El caso descrito no tenía déficit congénito de glutatión sintetasa (GS), tampoco tenía cetoacidosis, ni ácido láctico elevado, ni había ingerido metanol, salicilatos o etilenglicol, pero sí tenía elevados niveles de PiroGlu en plasma y orina. Desde entonces, esta causa de acidosis metabólica con elevación del anión GAP ha sido altamente reconocida, aunque poco se sabe de la utilidad pronóstica o de evolución del paciente.

En una situación de estrés oxidativo e incremento del potencial redox se esperan encontrar bajos niveles de GSH y altos niveles de GSSH. En un estudio se observó que en los niños con sepsis, las concentraciones de GSH en sangre y las tasas de síntesis disminuyeron (299), mientras que las relaciones redox de GSH en sangre (GSSG:GSH) aumentaron (300) lo que sugiere un incremento del estrés oxidativo. Numerosos estudios (301–303), relacionan niveles bajos de GSH con aumento del PiroGlu. Altos niveles de PiroGlu se asocian con un alto estrés oxidativo (304,305). Metges et al. (306) confirmó que la restricción de aminoácidos de glicina o azufre altera la cinética de PiroGlu y su excreción urinaria, otra razón que explica cómo la alteración de los precursores de la formación de GSH también altera el ciclo gamma-glutamil.

Como se puede observar en el ciclo gamma-glutamil (**Figura 3**), un descenso de la GSH en los pacientes sépticos se puede producir por tres razones: (I) un descenso en los niveles de ATP impide que la enzima 5-oxoprolinasa (ATP dependiente) convierta el PiroGlu a Glu, causando una acumulación de PiroGlu y además en ciclo gamma-glutamil se bloquea; (II) la depleción de GSH debido a la demanda causada por la necesidad de eliminar radicales libres ya que el paciente está incrementando su estrés oxidativo; (III) la activación de la enzima gamma-glutamilcisteinasintetasa que contribuye a continuar con el ciclo fútil sin la síntesis de GSH.

Diversos estudios indican que un incremento de los radicales libres causa un descenso del GSH (307–310). Los radicales libres consumen a la GPx y ésta se va regenerando por el GSH, y si se producen en grandes cantidades, llega un momento que

el GSH disminuye y no le da tiempo a formarse con mayor velocidad que eliminarse, por ello se encuentra depleccionado.

En la situación metabólica de un paciente con *shock* séptico se produce una acusada deficiencia del GSH, sobretodo producida por la acción de las citoquinas, fundamentalmente el TNF- α , ya que estas sustancias inhiben la GPx que es la responsable de mantener el GSH reducido. Esta depleción de GSH activaría la enzima gamma-glutamylcisteinyl synthetase que pertenece al ciclo gamma-glutamyl, causando un exceso de gamma-glutamylcisteína que se convierte en PiroGlu. El paso de PiroGlu a Glu requiere de ATP, por lo tanto sería la reacción limitante del ciclo, que puede observarse en la **Figura 3**. Esto provoca la acumulación de PiroGlu. Por lo tanto, el exceso de PiroGlu en un paciente séptico sin un déficit enzimático en el ciclo de gamma-glutamyl podría estar asociado con el agotamiento de GSH, y por lo tanto, con el excesivo estrés oxidativo y sus consecuencias negativas, derivando a un fallo multiorgánico y la muerte.

En vista a estos antecedentes, sería interesante medir la cantidad de pacientes que tienen una acidemia piroglutámica y asociarlo con el ácido glutámico y la glutatión peroxidasa, como un predictor del estrés oxidativo generado por la depleción de GSH.

Si la prevalencia de acidemia piroglutámica fuera elevada en pacientes sépticos, en presencia de acidemia metabólica desproporcionada a los hallazgos clínicos (hiperlactaemia, fallo renal, cetoacidosis...), el déficit de GSH podría ser responsable y habría que considerar su reposición mediante la administración de N-acetilcisteína.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Justificación, hipótesis y objetivos.

2.1. Justificación.

El paciente con sepsis presenta un estado catabólico exacerbado, lo que aumenta el gasto total de energía, la degradación de proteínas y la pérdida de peso. De esta forma, el sistema inmunitario resulta alterado, evolucionando hacia una hiperactivación o inmunosupresión que empeora aún más el pronóstico de sepsis. También se liberarán mediadores proinflamatorios endógenos, que pueden conducir a la disfunción orgánica múltiple y contribuir a una mayor mortalidad (3). Por otro lado, aparece un elevado estrés oxidativo que se produce tanto por exceso en la producción de radicales libres como por el déficit en las defensas antioxidantes. Uno de los sistemas antioxidantes defensivos endógenos más importantes y más abundantes es la GPx, que requiere de GSH para su acción, quedando regenerada para poder eliminar radicales libres. En nuestros pacientes coincide el aumento de radicales libres con el descenso de GSH por consumo, coincidiendo con los resultados de diversos autores (307–310). El correcto funcionamiento de la ruta gamma-glutamil es clave para la síntesis correcta del GSH y, para que éste se encuentre en condiciones óptimas para regenerar la enzima GPx. Por lo tanto, se deduce que los niveles de PiroGlu elevados en el paciente crítico se producen como respuesta a un bloqueo en la ruta gamma-glutamil provocado por el consumo de ATP y por la degradación de GSH.

En este estudio pretendemos medir la prevalencia de pacientes que presentan elevados niveles de PiroGlu como consecuencia de un elevado estrés oxidativo. Esta molécula se encuentra acumulada como consecuencia de la depleción de glutatión y bloqueo de la ruta gamma-glutamil. Nuestro propósito es esclarecer el comportamiento de las moléculas involucradas en esta ruta en pacientes críticos para poder proponer y utilizar tratamientos que repongan directa o indirectamente el GSH y que la eliminación de radicales libres no perjudique en gran medida al estado nutricional y evolución de estos pacientes durante su estancia en UCI. Es por ello, que realizamos una evaluación clínico-nutricional de los pacientes al inicio como a los tres días de estancia en UCI. El tratamiento de reposición con “Acetil-cisteína” (NAC) podría ser una posibilidad terapéutica.

2.2. Hipótesis.

Los pacientes críticos con *shock* séptico presentan altos niveles de PiroGlu, y bajos niveles de Glu y GPx, lo que demuestra que se produce un bloqueo en el ciclo gamma-glutamil, no llegando a sintetizarse el GSH, y no regenerándose la GPx, por lo que no se eliminan los radicales libres, y el estado clínico-nutricional de los pacientes críticos del estudio empeora.

Resumiendo, la alta presencia de PiroGlu en pacientes con *shock* séptico sería un indicador de alto estrés oxidativo debido a la deficiencia de GSH, lo que permite prevenir y corregir esta situación desde el inicio y durante su estancia en UCI, mejorando su respuesta al tratamiento y evolución.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivos principales.

- 1.- Evaluar la prevalencia de acidemia piroglutámica como predictor de elevado estrés oxidativo por agotamiento de GSH en pacientes críticos con *shock* séptico.
- 2.- Analizar el PiroGlu, Glu y GPx en la población crítica y comparar sus niveles con sujetos controles.
- 3.- Estudiar la posible asociación entre las variables del estudio implicadas en el ciclo gamma-glutamil.

2.3.2. Objetivos secundarios.

- 1.- Analizar los niveles de la CAT y estudiar su asociación con los componentes de la ruta del GSH.
- 2.- Analizar los niveles de Se y estudiar su asociación con el resto de componentes de la ruta.
- 3.- Analizar el estatus de las vitaminas B12 y Fol, que participan en la ruta de la homocisteína y estudiar su asociación con los componentes de la ruta del GSH.
- 4.- Analizar la Vit D y estudiar su estatus en los pacientes con *shock* séptico, asociándola con el resto de parámetros.
- 5.- Analizar los niveles de IL-6 y estudiar su asociación con parámetros de marcadores de fase aguda.
- 6.- Asociar los parámetros anteriores en pacientes críticos, con indicadores de morbilidad: tiempo de estancia en UCI, ventilación mecánica, APACHE y SOFA.
- 7.- Asociar todos los parámetros anteriores analizados con la mortalidad de los pacientes con *shock* séptico.
- 8.- Estudiar la evolución de todos los parámetros a los 3 días de estancia en la UCI de los pacientes con *shock* séptico.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Búsqueda bibliográfica.

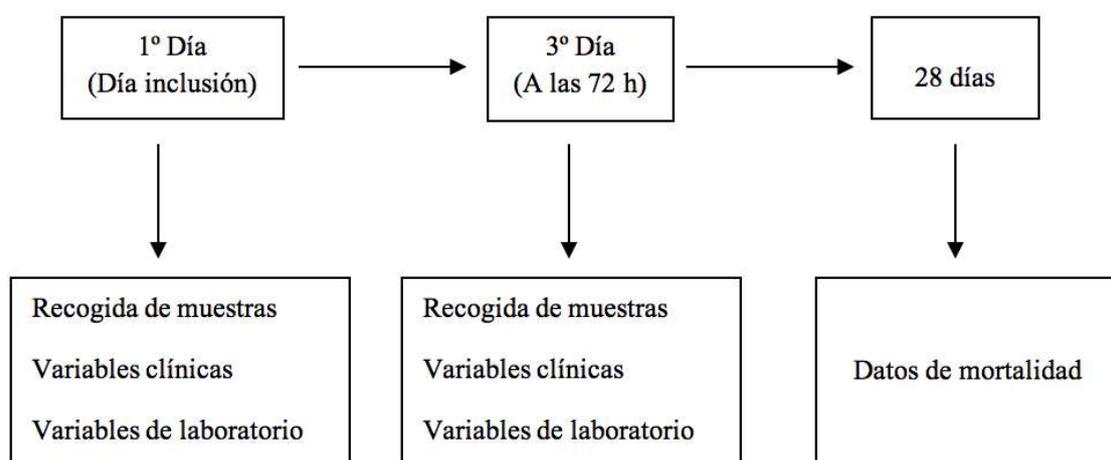
Se realizó una búsqueda bibliográfica en las bases de datos Medline y Embase a partir de los buscadores de Pubmed, Google Scholar, Crochrane e Índice Médico Español (IME). En la búsqueda se utilizaron las siguientes palabras clave: sepsis, septic *shock*, SIRS, pyroglutamic acid, glutamicacid, interleukin-6, vitamin B12, folic acid, cooper, vitamin D, total antioxidantcapacity, peroxidase glutathione, SOFA, APACHE, mortality, gamma-glutamylcycle, homocysteine, n-acetylcysteine.

3.2. Diseño del estudio.

El diseño del estudio se basa en un estudio prospectivo, observacional y analítico, de seguimiento del paciente crítico con *shock* séptico en la UCI que se comparó con un grupo de individuos sanos como controles.

El estudio de seguimiento se realizó desde la admisión del paciente crítico hasta los tres días siguientes de estancia en la UCI. Además, se realizó un seguimiento posterior hasta 28 días después del alta en la UCI para registrar la mortalidad. La selección de los pacientes se realizó en la UCI del Hospital Virgen de las Nieves, en Granada (España). En la **Figura 5** se muestra la secuencia de recogida de muestras y datos clínicos y analíticos.

Figura 5.- Actuación en la recogida de muestras y variables.



Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Virgen de las Nieves y de la Universidad de Granada y se obtuvo el consentimiento informado de pacientes o familiares que aceptaron su participación en el mismo. Este estudio se realizó también de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y de acuerdo con la Conferencia Internacional sobre Armonización / Estandarización de Buenas Prácticas Clínicas.

3.3. Sujetos del estudio.

Los pacientes que se seleccionaron fueron aquellos que conforme se hacía el ingreso en la UCI, es decir, de forma consecutiva, cumplieran los criterios de inclusión. Se reclutaron 30 pacientes adultos en un principio, pero sólo pudimos obtener muestras de 28 pacientes siendo estos últimos los que forman la muestra total de nuestros casos. La inclusión en el estudio se realizó siguiendo los criterios de consenso de *shock* séptico (9). A continuación se muestran los criterios de inclusión de los casos del estudio:

- Tener más de 18 años.
- Tener confirmado los criterios de SRIS, que se cumple cuando se tienen tres o más de estos criterios:
 - o Temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$.
 - o Frecuencia cardíaca > 90 lpm/min.
 - o Frecuencia respiratoria > 20 rpm/min o $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg.
 - o Leucocitos $> 12000 /\text{mm}^3$ o $< 4000 /\text{mm}^3$ o > 10 % de leucocitos inmaduros (bandas).
- Acidemia metabólica con anion Gap elevado durante más de 4 horas.
- Necesidad de tratamiento vasopresor.
- Hemocultivo positivo.
- Contar con el consentimiento informado por parte del paciente o familiar directo.

Criterios de exclusión de los casos en el estudio:

- Tener una deficiencia de glutatión sintetasa.
- Tener una intoxicación por paracetamol o cualquier otro medicamento que interfiera en la ruta del GSH, como la flucoxacilina.

La selección de estos pacientes fue realizada por médicos intensivistas pertenecientes a la UCI del Hospital Virgen de las Nieves. Estos intensivistas participaron en el estudio haciendo el reclutamiento de los pacientes siguiendo los criterios de inclusión y exclusión. Los intensivistas también participaron en el estudio recogiendo los datos clínicos de los pacientes.

Con respecto a los controles, se seleccionaron muestras de personas mayores de 18 años sanos, sin enfermedades crónicas inflamatorias y con parámetros dentro de la normalidad. Se consideraron los siguientes parámetros: creatinina, proteína C reactiva (PCR), transaminasas, amilasa, glucosa y colesterol, asegurando también que los hemogramas y coagulación de estos pacientes estuvieran dentro de la normalidad.

3.3.1. Datos registrados.

Se registraron una serie de datos clínicos y analíticos en los pacientes con *shock* séptico incluidos en el estudio. Estos datos se recogieron el día de inclusión en el estudio, y al tercer día de estancia en la UCI.

Variables clínicas

Se registraron una serie de datos clínicos: la edad del paciente, diagnóstico, sexo, puntuación de APACHE II, y puntuación SOFA, días de estancia en la UCI y la supervivencia del paciente a los 28 días; también se registraron parámetros cardiocirculatorios (PAM, frecuencia cardíaca y necesidad de tratamiento con vasopresores) y parámetros respiratorios (ventilación mecánica o espontánea, Fracción de oxígeno inspirada (FiO_2), Presión parcial de oxígeno arterial / Fracción de oxígeno inspirada (PaO_2/FiO_2), Presión espiratoria positiva (PEEP), Complianza (Cst), Presión parcial arterial de dióxido de carbono ($PaCO_2$)).

Variables de laboratorio

Los datos bioquímicos registrados fueron:

- Equilibrio ácido - base: exceso de bases, pH, bicarbonato, anionGAP.
- Función renal: creatinina, ureae iones.
- Función hepatocelular: Aspartato transaminasa o Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT o AST), Alanina Transaminasa o Glutamato Piruvato Transaminasa (GPT o ALT) y bilirrubina.
- Coagulación: Ratio Internacional Normalizado (INR), Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA), Factor V, plaquetas, fibrinógeno y dímero D.
- Hemograma completo.
- Marcadores de fase aguda: ácido láctico, PCR, procalcitonina (PCT) y lactato deshidrogenasa (LDH).

Estos datos se recogieron en una ficha para cada paciente y posteriormente se transcribieron a la base de datos del programa estadístico *Statistical Package for the Social Science* (SPSS).

3.4. Recolección de las muestras.

Se tomaron muestras de sangre y orina dos veces para cada paciente. La primera extracción: el día de la inclusión en el estudio que coincide con el día de ingreso en la UCI. La segunda extracción: al tercer día de inclusión en el estudio. En la extracción de las muestras de sangre y orina participaron enfermeras y auxiliares de enfermería del servicio de la UCI del Hospital Virgen de las Nieves. Para cada paciente se recogieron las siguientes muestras:

- 2 tubos de sangre:
 - Tubo sin anticoagulante: tubo de 8.5 mL, de tapón amarillo, con gel SSTTMII Advance (BD Vacutainer®).
 - Tubo con heparina de litio como anticoagulante: Tubo de 10 mL, de tapón verde, con heparina de litio 170 I.U. (BD Vacutainer®).
- 1 tubo de orina: Tubo de 10 mL, de tapón marrón, cónico, al vacío, de plástico, sin conservantes (BD Vacutainer®).

El tratamiento de las muestras fue el siguiente:

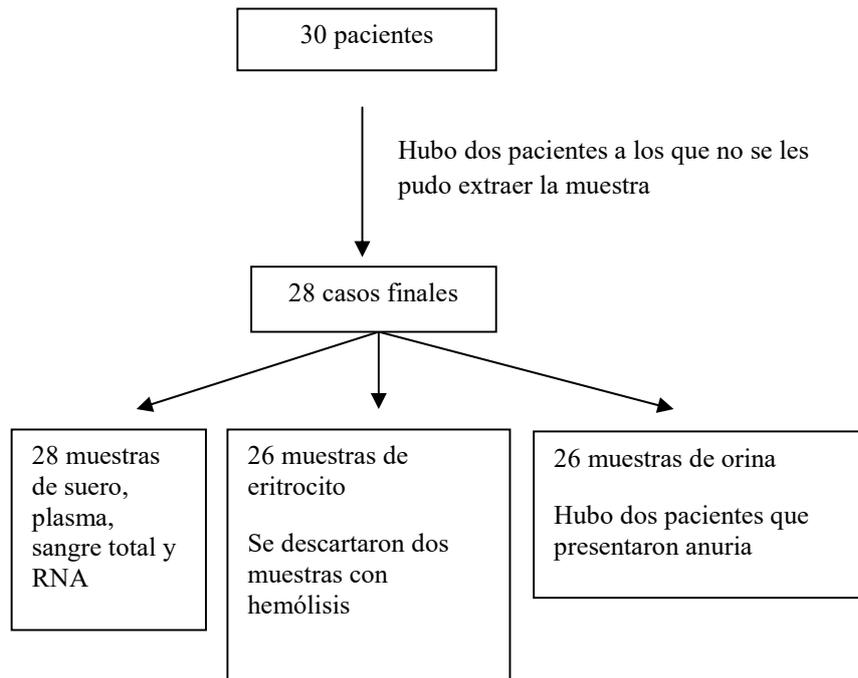
- Las muestras de sangre recogidas en tubos sin anticoagulante se centrifugaron inmediatamente a 3500 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se recogió el suero en tubos Eppendorf. En total se recogieron 5 alícuotas para cada paciente y cada extracción.
- Las muestras de sangre recogidas en tubos con heparina de litio, se recogió de la siguiente manera para cada paciente y cada extracción:
 - Plasma: El resto del tubo se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante (plasma) en 5 alícuotas en tubos Eppendorf.
 - Eritrocito: Con el hematocrito sobrante, se hicieron 3 lavados con suero fisiológico (0.9% NaCl) y se recolectaron 3 alícuotas de eritrocito limpio en tubos Eppendorf.
- Las muestras de orina se centrifugaron y se recogieron en 5 alícuotas en tubos Eppendorf.

Las muestras de suero, plasma, eritrocito limpio y orina se identificaron correctamente escribiendo en el contenedor directamente la siguiente información:

- Fecha de extracción.
- Número asignado consecutivo del caso.
- La letra “A” para la extracción del primer día y la letra “B” para la extracción del tercer día.
- Letra identificativa del tipo de muestra: “S” para el suero, “P” para el plasma, “E” para el eritrocito limpio y “O” para la orina.

Todas las muestras se almacenaron a -80 °C en los laboratorios de Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INUYTA) en el Centro de Investigación Biomédica (CIBM) antes de los análisis bioquímicos. Para las pruebas posteriores de los componentes de la ruta del GSH y estrés oxidativo, se esperó a obtener todas las muestras del estudio para realizar todas las medidas a la vez. La **Figura 6** muestra el diagrama de los pacientes que participaron en el estudio.

Figura 6. Distribución de muestras.



Los valores de referencia de las moléculas de estrés oxidativo como elPiroGlu, Glu y GPx, de los métodos utilizados para su medición, son desconocidos. Por lo tanto, se obtuvieron 28 muestras de suero y orina de personas sanas para ser utilizados como controles. Estas muestras se procesaron de la misma manera y se congelaron a -80 °C. Los datos analíticos básicos obtenidos se realizaron en el laboratorio del hospital y se obtuvieron con las analíticas solicitadas de urgencia desde el servicio de la UCI.

3.5. Valoración de la gravedad del paciente.

La puntuación de las escalas SOFA y del APACHE II se determinaron siguiendo los cálculos de las tablas que a continuación se describen. También se calcularon los días de ventilación mecánica, días de estancia en UCI y la mortalidad a los 28 días.

- Cálculo de la puntuación de la escala SOFA.

La puntuación de la escala SOFA se compone de la suma del puntaje obtenido de la evaluación de seis órganos, cada uno con una escala que va de 0 a 4 puntos, calificados según el grado de disfunción. Las características para establecer la puntuación se observan en la **Tabla 6**. Para el cálculo SOFA fue necesario utilizar los exámenes complementarios como la gasometría, bilirrubina, plaquetas y creatinina, además del examen de signos clínicos: PaO₂/FiO₂, escala *Glasgow* y la presión arterial media.

El sistema SOFA consiste en una medición diaria de posible fallo de seis órganos. Cada órgano se clasifica de 0 (normal) a 4 (el más anormal), proporcionando una puntuación diaria de 0 a 24 puntos.

Tabla 6. Puntuación *SequentialOrganFailureAssessment*.

Escala SOFA	0	1	2	3	4
Respiración: PaO ₂ /FiO ₂	> 400	≤ 400	≤ 300	≤ 200 ventilación mecánica	≤ 100 ventilación mecánica
Sistema nervioso: escala de coma de <i>Glasgow</i>	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Sistema cardiovascular (PAM o dosis de catecolaminas)	No hipotensión	PAM < 70 mm/Hg	*Dop ≤ 5 o Dop (cualquier dosis)	*Dop > 5 o Epi ≤ 0.1 o Nor ≤ 0.1	*Dop > 15 o Epi > 0.1 o Nor > 0.1
Hígado: bilirrubina (mg/dl)	< 1.2	1.2 – 1.9	2.0 – 5.9	6.0-11.9	> 12.0
Coagulación: Plaquetas × 10 ³	> 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Sistema renal (creatinina o aclaramiento)	< 1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9 (o < 500 ml/d)	> 5.0 (o < 200 ml/d)

*La dosis de medicación vasopresora está en µg/kg/min. PAM: presión arterial media. Dop: dopamina. Epi: adrenalina. Nor: noradrenalina.

- Cálculo de la puntuación de la escala APACHE.

Para calcular la puntuación de la escala APACHE II se suman variables fisiológicas y parámetros de laboratorio que resultan fáciles de calcular en la UCI. Las características para hacer el cálculo se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Sistema de valoración de la gravedad APACHE II.

Puntuación	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Tª rectal (°C)	> 40,9	39-40,9		38,5-38,9	36-38,4	34-35,9	32-33,9	30-31,9	< 30
Presión arterial media	> 159	130-159	110-129		70-109		50-69		< 50
Frecuencia cardíaca	> 179	140-179	110-129		70-109		55-69	40-54	< 40
Frecuencia respiratoria	> 49	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		< 6
Oxigenación: Si $FiO_2 \geq 0.5$ (A-aDO ₂) Si $FiO_2 \leq 0.5$ (PaO ₂)	> 499	350-499	200-349		< 200, > 70	61-70		56-60	< 56
pH arterial	> 7,69	7,60-7,69		7,50-7,59	7,33-7,49		7,25-7,32	7,15-7,24	< 7,15
Na plasmático (mmol/l)	> 179	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	< 111
K plasmático (mmol/l)	> 6,9	6,0-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3,0-3,4	2,5-2,9		< 2,5
Creatinina * (mg/dl)	> 3,4	2-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		< 0,6		
Hematocrito (%)	> 59,9		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		< 20
Leucocitos (x 1000)	> 39,9		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		< 1

*Doble puntuación si fallo renal crónico. Gradiente alveolo-arterial de oxígeno: A-aDO₂; Fracción inspirada de oxígeno: FiO₂

Para completar el cálculo también se tienen en cuenta otros factores como son la edad y el estado de salud crónico del paciente. En cuanto a la edad se suman los valores indicados en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Puntuación de la edad en el cálculo del APACHE II.

Edad	Puntuación
≤ 44	0
45 – 54	2
55 – 64	3
65 – 74	5
≥ 75	6

En cuanto al estado de salud crónico del paciente, si se trata de un paciente no quirúrgico o en postoperatorio de cirugía urgente se suman 2 puntos, y si se trata de un paciente con postoperatorio de cirugía programada se suman 5 puntos.

Se realizó un cálculo del APACHE II teniendo en cuenta los tres grupos de parámetros hablados anteriormente. Con el cálculo del APACHE II se puede averiguar el riesgo de mortalidad del paciente en la UCI. En la **Tabla 9** se muestra la estratificación de la puntuación APACHE II con el riesgo de mortalidad (%).

Tabla 9: Asociación del APACHE II con la mortalidad intrahospitalaria.

Rangos de puntuación APACHE II	0-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	> 35
Mortalidad hospitalaria (%)	4	7	14	24	40	52	72	82

Los parámetros respiratorios de PAS, PaO₂/FiO₂, PaCO₂, PEEP y capacitancia, se calcularon mediante el método de amperometría.

3.6. Métodos analíticos.

3.6.1. Determinación de ácido piroglutámico y ácido glutámico.

El ácido piroglutámico y el ácido glutámico se realizaron mediante la técnica LC/MS en el Centro de Instrumentación Científica perteneciente a la Universidad de Granada. Esta técnica combina la capacidad de separación física de los materiales de la cromatografía líquida con la capacidad de identificación selectiva molecular y cuantificación de la espectrometría de masas.

Los analizadores que se utilizaron fueron un cromatógrafo de líquidos de ultra-alta resolución (UPLC) (Waters, Modelo Aquity Quaternary solvent manager), acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (triple-quad) (Waters, Modelo XEVO TQ-S).

Esta técnica comienza con el sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en la que la muestra se introduce en una columna quedando envuelta en la fase móvil, produciéndose la separación molecular. Cuando el líquido (la fase móvil junto con la muestra) sale de la columna, se difumina en unas microgotas que se evaporan y se liberan los analitos de la muestra través del electrospray.

El electrospray se basa en un proceso de “evaporación-ionización”. Consiste en la vaporización del líquido al pasar por un capilar de acero inoxidable. Este capilar, que se encuentra rodeado por un electrodo cilíndrico, al estar sometido a una tensión de 3-6 KV, se calienta y el líquido sale en forma de aerosol hacia la cámara de ionización. A su paso por el capilar, el analito se ioniza porque se producen intercambios de carga, por lo que esta fase también se considera de ionización.

Posteriormente, el analito ionizado se separa y registra en el espectrómetro de masas en un sistema de vacío. El detector, un analizador de triple cuadrupolo está formado por tres cuadrupolos que se sitúan de forma secuencial. El primero y tercero son cuadrupolos normales que funcionan como filtros de masas y el segundo se denomina celda de colisión. En esta celda, los iones colisionan y se fragmentan. La detección se lleva a cabo por una señal eléctrica que da lugar al espectro de masas, que es una representación gráfica de la frecuencia de los iones del analito detectados según su relación masa/carga.

El procedimiento de laboratorio que llevamos a cabo fue el siguiente:

Se descongeló una alícuota de orina y otra de suero por cada paciente, tanto de las extracciones del primer día como de las del tercero. En primer lugar, se realizó un pretratamiento de precipitación de proteínas (311) del suero y de la orina. Las proteínas de las muestras se precipitaron con acetonitrilo siguiendo el siguiente esquema:

- Se añadió la muestra en un tubo Eppendorf.
- Se añadió el acetoneitrilo.
- Las muestras se agitaron y luego se incubaron a temperatura ambiente, manteniéndolas con movimiento de agitación circular.
- Las muestras se centrifugaron a 14,000 revoluciones por minuto durante 5 minutos.
- Se transfirió el sobrenadante a la botella de tapón de rosca.
- Inmediatamente después, las muestras fueron procesadas en el cromatógrafo LC/MS.

Se realizó una curva patrón empleando estándares con concentraciones conocidas y crecientes de PiroGlu y otra curva con Glu. Las concentraciones de la curva de PiroGlu fueron las siguientes: Punto 1: 31.25 μL ; Punto 2: 62.50 μL ; Punto 3: 125.00 μL ; Punto 4: 250.00 μL ; Punto 5: 500.00 μL ; Punto 6: 1000.00 μL .

Figura 7. Curva patrón del ácido piroglutámico.

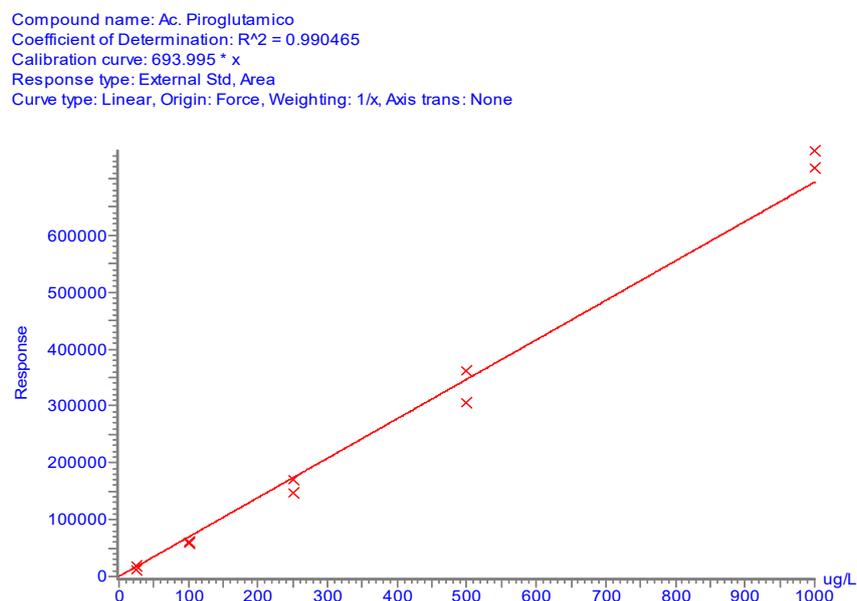
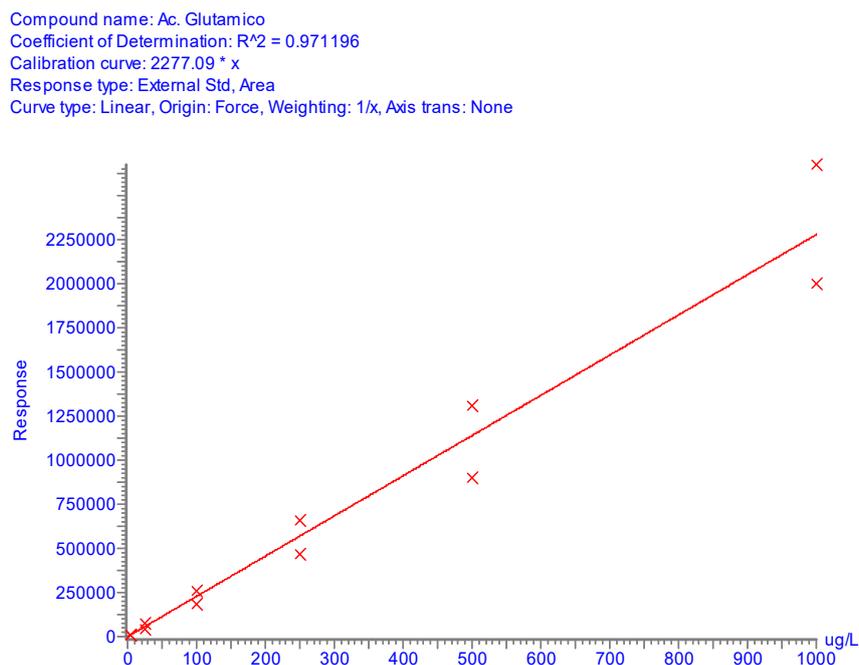


Figura 8. Curva patrón del ácido glutámico.

Se realizó un lavado al principio y al final de la curva, y se realizó otra curva después de todas las muestras como control, tanto en la determinación de Glu como en la de PiroGlu.

El modelo del equipo con el que se hizo la determinación “Aquity Quaternary”, permite realizarlo con HPLC o Cromatografía Líquida de Ultra-Alta Resolución (HUPLC). En nuestro caso usamos HUPLC, con el que además requerimos poca cantidad de muestra.

Como los dos analitos tienen un peso molecular muy parecido, se pudo hacer la identificación y cuantificación de los dos en el mismo lote de paso por la columna.

Se hizo el análisis de Glu y PiroGlu utilizando el mismo lote de reactivos tanto en la determinación de las muestras de orina como en la determinación de las muestras de suero.

Cálculos:

Para la realización de los cálculos, se extrapoló el área de la curva obtenida de las muestras en la curva patrón, obteniéndose la concentración de los analitos.

Expresión de los resultados:

Los resultados de Glu y PiroGlu en suero y orina se expresaron en $\mu\text{g/L}$. Para mejorar los resultados, tuvimos en cuenta la función renal y determinamos la creatinina haciendo un cálculo de Glu y PiroGlu en función de la creatinina.

Unidades de PiroGlu y creatinina:

Ácido piroglutámico = $\mu\text{g/L}$.

Creatinina = mg/dL .

Paso de unidades:

Ácido piroglutámico $\mu\text{g/L}$. $1\text{L}/10\text{ dL} = \text{Ácido piroglutámico} * 10 \mu\text{g/dL}$.

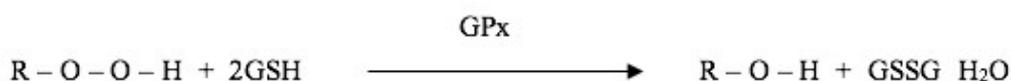
Ácido piroglutámico/creatinina = $\mu\text{g/dL}/\text{mg/dL} = \mu\text{g}/\text{mg}$.

De la misma manera se calculó el Glu/creatinina.

3.6.2. Determinación de la glutatión peroxidasa.

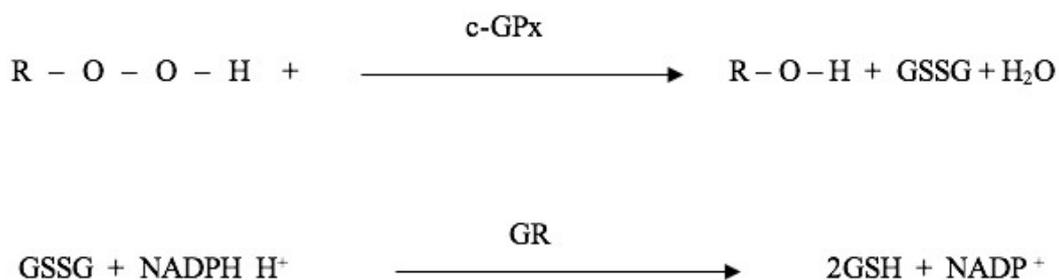
La glutatión peroxidasa celular (c-GPx) se determinó siguiendo el método de Paglia y Valentine (1967) (312), modificado en 1976 por Lawrence y Burk (313). El ensayo consiste en una medida indirecta de la actividad de la c-GPx, evaluado con un ensayo colorimétrico. El fundamento del ensayo es el siguiente:

La actividad de esta enzima consiste en catalizar la reacción de reducción del peróxido de hidrógeno en agua y de peróxidos orgánicos en el correspondiente alcohol estable, utilizando GSH como sustrato y generando GSSG.



La gran mayoría de estas enzimas están formadas por 4 subunidades proteicas, y cada subunidad contiene una molécula de Sec en su centro activo. Esta Sec tiene la función de participar directamente en la donación de electrones al peróxido que se queda reducido. La enzima utiliza el GSH como donador de electrones para devolverle el electrón a la Sec y regenerarla a su forma reducida. La GPx acepta una gran variedad de peróxidos como sustrato.

El GSSG que se forma después de la reacción de reducción del peróxido por la GPx, es reciclado a su estado reducido por la enzima GR, estas dos reacciones se muestran a continuación:



El NADPH absorbe a 340 nm. Con el descenso de la absorbancia a 340 nm debido al paso de NADPH a NADP⁺ se puede medir la actividad de la enzima c-GPx. Se parte de una solución que contiene NADPH, GSH y GR, que se le añade el contenido de los eritrocitos de la muestra. La reacción enzimática es iniciada añadiendo tert-butil hidroperóxido. En este momento se llevan a cabo las dos reacciones enzimáticas expuestas arriba, una catalizada por la GPx (que estamos midiendo) y otra catalizada con la GR que está añadida en exceso en la reacción por el ensayo. Por lo tanto, el ratio de descenso en la absorbancia a 340 nm será directamente proporcional a la actividad de la c-GPx de la muestra. Se utilizaron los siguientes reactivos:

- Reactivo NADPH: Consiste en un liofilizado que contiene una mezcla de β-nicotinamida-adeninucleótido fosfato, GSH y GR. Para mantener la estabilidad de este reactivo, no se puede congelar, su actividad tiene una duración de 9 horas a 21 – 27 °C y de 3 horas a 37 °C, después de reconstituirlo fue utilizado a una temperatura de 25 °C.
- Tampón del ensayo: pH de 7.6. Se mantuvo a temperatura ambiente durante el ensayo.

- Tert-butil hidroperóxido. Una vez diluido se mantuvo a la temperatura del ensayo, unos 25 °C.

Los pasos que se siguieron para la medida de la actividad de la GPx fueron los siguientes: En primer lugar se hizo un pretratamiento donde se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- 1) Se sacan las muestras de eritrocito limpio del congelador de – 80 °C, se descongelaron a temperatura ambiente en una gradilla y posteriormente se mantuvieron en hielo en todo momento.
- 2) Se mezclaron las alícuotas de los eritrocitos con cuatro volúmenes de agua destilada pasándolas a un nuevo Eppendorf.
- 3) Se centrifugaron los Eppendorf a 10.000 rpm durante 15 minutos.
- 4) Se diluyó con Buffer del ensayo.
- 5) Se reconstituyó el reactivo de NADPH con buffer del ensayo.
- 6) Se preparó la dilución de terc-butilo:
 - Predilución
 - Dilución
- 7) Se utilizó un lector de microplacas, BiostackNeo (BioTek) de Izasa Scientific. Se prepara el ensayo configurando el espectrofotómetro a una temperatura de 25 °C, una longitud de onda de 340 nm y la posición de cada muestra. También se configura la lectura múltiple al tratarse de una reacción cinética. Se determinaron 7 puntos de lectura de la absorbancia.
- 8) Se introdujo en los pocillos de la microplaca utilizando una microplaca estándar de 92 pocillos:
 - Buffer del ensayo.
 - Reactivo de NADPH.
 - La muestra.

Se mezclan todos los reactivos muy bien en los pocillos pipeteando dos veces.

- 9) Se puso agua destilada como blanco en el primer pocillo de la microplaca.
- 10) Se añadió a los pocillos el terc-butilopipeteando dos veces para mezclarlo bien con la multimicropipeta automática, e inmediatamente se hace la lectura. Se espera un tiempo prudente desde que se añadió el tert-butilo hasta la primera

lectura para evitar recoger picos o variaciones altas en los resultados de absorbancia.

Cálculos:

- Restar la absorbancia del blanco a cada medida de absorbancia de las muestras.
- Averiguar la diferencia de absorbancia por minuto haciendo una media de las mismas a partir de las 7 lecturas.
- Convertir la absorbancia por minuto a 340 nm en cantidad de NADPH consumida en nmol/min/mL) utilizando la siguiente relación: $1 \text{ mU/mL} = 1 \text{ nmol NADPH/min/mL} = (A_{340}/\text{min})/0.00622$.

Se divide la absorbancia por minuto entre 0.00622. El coeficiente de extinción molar del NADPH es $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 340 nm.

Expresión de los resultados:

Los resultados de la actividad de la c-GPx se expresaron en unidades por gramo de hemoglobina: Unidades de la GPx y de la Hb: GPx = mU / mL; Hb = gr/dL.

Paso de unidades:

Las lecturas de las absorbancias de las muestras de casos y controles se midieron utilizando la misma microplaca y el mismo lote de reactivos.

$$\text{GPx mU / mL} \cdot 100 \text{ mL / 1 dL} = \text{GPx} * 100 \text{ mU / dL}$$

$$\text{Actividad de la GPx / gr de hemoglobina} = \text{GPx / Hb} = \text{mU/ dL / gr / dL} = \text{mU / gr}$$

3.6.3. Determinación de la capacidad antioxidante total.

El análisis de la CAT se realizó mediante espectroscopía de absorbancia en un lector de placas.

Para hacer una medición correcta del estrés oxidativo es esencial medir el conjunto de las especies reactivas de oxígeno, el daño oxidativo y la actividad antioxidante. La CAT no solo puede detectar los antioxidantes hidrofílicos como vitamina C, GSH, sino también antioxidantes hidrofóbicos como la Vitamina E.

Fundamento del ensayo: Cuando la muestra se pone en contacto con una solución de cobre (Cu^{++}), los antioxidantes de la muestra reducen el Cu^{++} a su forma Cu^+ . La reducción a Cu^+ se lleva a cabo con una solución cromática debathocuproína, y puede detectarse por absorbancia a una longitud de onda de 480-490 nm.

Reactivos y componentes que se utilizan en el ensayo:

- Liofilizado de ácido úrico: Se preparó de una solución 2 mM con agua destilada. Se utilizó como estándar.
- Diluyente de la muestra
- Solución de cobre (Cu^{++})
- Solución de parada
- Una microplaca de 96 pocillos

Además, se utilizó: un lector de microplacas que mide a una longitud de onda de 490 nm, pipetas automáticas multicanal, pipetas, tubos de ensayo y agua destilada.

Procedimiento del ensayo:

Reconstitución del liofilizado del estándar (2 mM de la solución de ácido úrico): Se añadió el liofilizado de agua destilada y se mantuvo durante unas horas a temperatura ambiente.

Preparación del estándar para la curva de calibración: Se diluyó la solución de ácido úrico 2 mM con agua destilada por 2, 4, 8, 16 y 32 veces, para obtener 5 niveles de diluciones distintas del estándar (1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.125 mM y 0.063 mM respectivamente). Para ello, se rotularon 6 tubos de ensayo, se incorpora el estándar 2 mM en el primer tubo, en el resto de tubos se añade el agua destilada, por último se fue

añadiendo 1 mL de cada tubo al siguiente tubo mezclándolo bien. De esta forma se obtuvieron las concentraciones de la curva patrón.

Preparación de las muestras:

La CAT se midió en el suero y en la orina de los 28 casos del estudio. Tanto las muestras de suero como de orina se descongelaron haciendo una predilución de éstas últimas. Dado que las muestras debían permanecer en frío después de descongelarlas, la determinación se hizo de forma inmediata. Esta inestabilidad es debida a algunos antioxidantes presentes como la vitamina C, ácido úrico y coenzima Q10. Se rotularon los tubos en el orden en el que van en los pocillos de la microplaca.

- En el primer tubo se añadieron el diluyente para hacer de blanco.
- En los siguientes tubos se añadieron la curva estándar por duplicado, 12 tubos en total.
- A continuación, se pusieron dos controles, uno con concentraciones más bajas y otro con concentraciones más altas. Se utilizaron dos soluciones de la curva estándar para el control bajo y control alto (0.125 mM y 0.5 mM, respectivamente).
- Se prepararon por último tantos tubos como muestras. Primero se pusieron las muestras de suero y después las muestras de orina.

En cada tubo se puso el diluyente y se añadió la muestra, estándar o control.

Lectura de la absorbancia:

Después de hacer la dilución de las muestras, se traspasó la muestra a los pocillos de la microplaca. Se utilizó un lector de microplacas, BiostackNeo (BioTek) de Izasa Scientific. Se preparó el ensayo configurando el espectrofotómetro a una temperatura de 25°C, a una longitud de onda de 490 nm, poniendo la posición de cada muestra, y configurando una doble lectura. La secuencia de lectura y de incorporar los reactivos es la siguiente:

- a) Lectura de la placa a 490 nm. 1ª lectura.
- b) Se añadió la solución de cobre y se mezcló pipeteando dos veces.
- c) Periodo de incubación.
- d) Se añade la solución de parada y se mezcla pipeteando dos veces.
- e) Lectura de la placa a 490 nm. 2ª lectura.

Cálculos:

Para calcular la absorbancia debido al cobre reducido se dividió la segunda lectura entre la primera lectura de absorbancia. Se hizo un cálculo de la curva de calibración, poniendo en el eje de abscisas la concentración de ácido úrico y en el eje de ordenadas la diferencia de las absorbancias (2ª lectura – 1ª lectura).

Para el resto de muestras se calculó la concentración de ácido úrico extrapolando en la curva. Las concentraciones de los controles se validan, puesto que estaban muy próximos al valor real. Para calcular el poder antioxidante se multiplicó la concentración de ácido úrico obtenido para cada muestra por 2189:

$$1 \text{ nM de ácido úrico} = 2189 \text{ } \mu\text{mol/L (poder reductor del cobre)}$$

Expresión de los resultados:

Finalmente, se expresaron los resultados de CAT en suero y orina en $\mu\text{mol/L}$. Los resultados se encontraron dentro del rango del ensayo: 21.9 - 4378 $\mu\text{mol/L}$ (poder reductor del ión cobre). Los valores de las muestras de suero se encuentran dentro del rango, observándose valores más elevados en las muestras de orina, motivo por el cual se diluye para poder ser calculadas y que no se salieran del rango del ensayo.

Para comparar la capacidad antioxidante total de los pacientes con *shock* séptico y los individuos sanos, se utilizaron valores de muestras de individuos sanos como controles. Estos controles se realizaron siguiendo el mismo procedimiento, con el mismo método descrito.

3.6.4. Determinación de selenio.

La determinación de selenio en plasma de estos pacientes se determinó en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada a partir del método de Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICPMS), utilizando el espectrofotómetro de masas con una fuente de ionización por antorcha de plasma y un filtro de iones porcuadrupolo NexION 300D de Perkin Elmer.

3.6.5. Determinación de cobre.

La determinación de cobre se hizo mediante espectrofotocopia de absorción atómica. Esta técnica se basa en la ley de Lambert-Beer, donde la absorción de un determinado elemento es directamente proporcional a la concentración de éste. La absorción atómica se fundamenta en el paso de los electrones de los átomos a orbitales más altos mediante la absorción de una cantidad de energía a una determinada longitud de onda. Cada elemento absorbe la energía provocando el paso de su electrón a un orbital superior a una sola longitud de onda.

Se realizó una curva patrón empleando estándares con concentraciones conocidas y crecientes de cobre y el patrón utilizado fue una solución de 1000 ppm de cobre.

Cálculos:

Los resultados de absorbancia obtenidos de las muestras se extrapolaron en la curva patrón y se obtuvo la concentración. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/dL}$.

3.6.6. Determinación de vitamina B12, ácido fólico y vitamina D.

Las determinaciones de vitamina B12, ácido fólico y vitamina D se realizaron utilizando un autoanalizador UniCelDxI[®] de BeckmanCoulter. La técnica usada fue el inmunoensayo cuantificado por electroquimioluminiscencia competitiva.

Determinación de la B12:

Consiste en un ensayo inmunoenzimático de unión competitiva. El procedimiento de análisis y cálculo de la Vit B12 es el siguiente:

- Para desnaturalizar las proteínas unidas a la Vit B12 se añadió cianuro potásico alcalino y ditiotretol, pasando la Vit B12 a cianocobalamina.
- Terminada la neutralización, se añadió a la muestra un conjugado de factor intrínseco-fosfatasa alcalina (factor intrínseco porcino-fosfatasa alcalina bovina). La Vit B12 que está presente en la muestra se une a este conjugado.
- Posteriormente se añadieron partículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos anti-IgG murino de cabra (anticuerpos monoclonales anti-factor intrínseco murinos). El factor intrínseco del conjugado (factor intrínseco-fosfatasa alcalina) sobrante (el que no se ha unido a la Vit B12 de la muestra) se une al anti-factor intrínseco de partículas paramagnéticas.
- A continuación, se incubó y luego se aplicó un campo magnético. Las partículas paramagnéticas se quedan unidas al vaso de reacción y mediante un lavado se eliminan las moléculas que no han quedado unidas a las partículas paramagnéticas.
- Seguidamente se añade el sustrato quimioluminiscente Lumi-Phos*530 y utilizando un luminómetro, se mide la luz generada. Esta luz es inversamente proporcional a la concentración de Vit B12 de la muestra.
- La concentración de la Vit B12 se calcula mediante la sustitución en la curva de calibración previamente determinada con los calibradores.

Determinación del ácido fólico:

Consiste en un ensayo inmunoenzimático de unión competitiva. El procedimiento de análisis y cálculo del Fol es el siguiente:

- En primer lugar, se añadió a la muestra una proteína de unión a Fol que se une al Fol de la muestra.
- Después se añadieron anticuerpos murinos anti-proteína de unión a Fol. Al añadir el conjugado Fol-fosfatasa alcalina, éste se va a unir al exceso de proteína de unión a Fol que quede unida a anti-proteína de unión a Fol.

- Cuando se añadieron anticuerpos de cabra anti-anticuerpos de captura murinos unidos a partículas paramagnéticas, se unirán a la anti-proteína de unión a Fol (unida a la proteína de Fol, unida al conjugado Fol-fosfatasa alcalina).
- Después de aplicar un campo magnético y hacer un lavado de las moléculas que no han quedado adheridas a las partículas paramagnéticas, se hizo una lectura con un luminómetro. La cantidad de luz generada es inversamente proporcional a la concentración de Fol de la muestra.

Determinación de la vitamina D:

La determinación consiste en un inmunoensayo de unión competitiva de dos pasos donde se midió exactamente la 25(OH)vitamina D:

En primer lugar, se deposita en la cubeta de reacción un agente de liberación de la proteína de unión a la 25(OH)vitamina D junto con la muestra, a continuación se añaden unas partículas paramagnéticas recubiertas de anticuerpos monoclonales de oveja anti-25(OH)vitamina D.

Durante el periodo de incubación, se desprende la 25(OH)vitamina D de las proteínas de unión a la vitamina D y se une a los anticuerpos monoclonales inmovilizados en la fase sólida anti-25(OH)vitamina D. En una segunda incubación se aplica un campo magnético. Las moléculas que permanezcan en la fase sólida se quedan pegadas a las paredes de la cubeta, y las moléculas que no han quedado unidas se eliminan mediante un lavado. A continuación, se añade a la cubeta de reacción un sustrato quimioluminiscente Lumi-Phos*530.

Se midió la luz generada por la reacción mediante un luminómetro, siendo ésta inversamente proporcional a la 25(OH)vitamina D de la muestra. Los cálculos de la concentración de 25(OH)vitamina D se determinan mediante la extrapolación en una curva de calibración de múltiples puntos determinada anteriormente.

3.6.7. Determinación de la interleuquina-6

Se hizo la determinación en el autoanalizador Centauro System de Siemens, utilizando un inmunoensayo y cuantificada por electroquimioluminiscencia competitiva, inmunoanálisis directo tipo “sandwich”.

Reactivos utilizados:

- Reactivo de fase líquida: contiene anticuerpos monoclonales de ratón anti IL-6 marcado con ester de acridinio.
- Reactivo de fase sólida: micropartículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos monoclonales de ratón anti IL-6.

Procedimiento del análisis:

- Se incorporó la muestra a una cubeta de reacción.
- Se añadieron el reactivo de la fase sólida y el reactivo de la fase líquida y se incubó a 37 °C.
- Tras aplicar un campo magnético, se separó la fase sólida de la líquida, se aspiró eliminando los restos que no han quedado adheridos a las partículas paramagnéticas y se lava.
- Se añadió el reactivo ácido y el reactivo básico para que tuviera lugar la reacción de quimioluminiscencia.
- Se hizo una lectura con un luminómetro que mide unidades relativas de luz (URL). La luz generada es directamente proporcional a la IL-6 de la muestra. A partir de una curva de calibración previamente calculada se sustituyeron los valores de URL para calcular la concentración de IL-6.

Los valores de IL-6 se expresaron en pg/mL. Los valores de referencia: indetectable o hasta 4.4 pg/mL.

3.6.8. Otras magnitudes bioquímicas y hematológicas.

Los métodos analíticos utilizados para la determinación de estos parámetros son los que utilizan en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, que fue donde se determinaron con las analíticas rutinarias solicitadas desde el servicio de la UCI.

3.7. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico SPSS versión 21.0, para Windows. La significación estadística se definió como $p < 0.05$.

Las variables cualitativas se presentaron como frecuencias y porcentajes, y las variables cuantitativas como media \pm desviación estándar (DE). Para las variables continuas, la hipótesis de la normalidad se probó usando la prueba de Shapiro-Wilk.

Las diferencias en Glu, PiroGlu y GPx entre pacientes con *shock* séptico y grupos control se evaluaron mediante el test de Mann-Whitney. Pretendimos analizar si existían diferencias estadísticamente significativas en las medias de estas variables cuantitativas entre el grupo con *shock* séptico y el grupo control.

Las variables cuantitativas en los distintos puntos del tiempo (primer y tercer día) se compararon mediante la prueba t para muestras relacionadas en el caso de las variables continuas y la prueba Wilcoxon para las variables no paramétricas, para comparar la evolución del paciente crítico en la UCI. Este test nos permite hacer un seguimiento hasta el tercer día y estudiar la evolución de los parámetros obtenidos en el mismo individuo. Es decir, comparamos el resultado de la variable del sujeto consigo mismo en los dos puntos del tiempo. Este test nos da una información más acertada, ya que, se trata de parámetros clínicos con una variabilidad interindividual alta y puede resultar erróneo utilizar un test que compare medias y desviaciones estándar globales.

Las variables cuantitativas se compararon entre sí para ver si existía alguna asociación entre las variables bioquímicas, las variables clínicas, las variables de severidad y las variables propias de nuestro estudio de la ruta del GSH. Se midió la correlación utilizando el coeficiente de correlación de Pearson para las variables que siguen una distribución normal y el coeficiente de correlación de Spearman para las variables no paramétricas, estudiando si existía o no correlación, y en caso positivo, si la correlación era positiva o negativa. Para el estudio de mortalidad también se utilizó un test de Mann-Whitney.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de las características de la muestra.

4.1.1. Distribución de la muestra de los casos y los controles.

El estudio se compuso de una muestra de 56 personas repartidas en dos grupos. El grupo control lo formaron 28 personas sanas seleccionadas de manera aleatoria con edades similares al del grupo casos estudiados. El grupo de casos lo formaron un total de 28 pacientes críticos que cumplieron los criterios de inclusión además de presentar una situación de *shock* séptico.

El grupo de los controles estuvo compuesto por 12 mujeres (42.9%) y 16 varones (57.1%) con una media de edad de 58.4 (DE = 10.8) años y un rango de 36 - 81 años. Este grupo de personas no padecían ninguna enfermedad inflamatoria, ni enfermedad crónica, y presentaron parámetros bioquímicos y hematológicos normales, es decir, con niveles plasmáticos dentro de los rangos de referencia. Los parámetros que se valoraron fueron el hemograma, coagulación básica (TTPA, tiempo de protrombina y fibrinógeno), creatinina, iones, PCR, transaminasas, bilirrubina, amilasa, glucosa y colesterol.

La distribución de la muestra referida al grupo de los casos, fue de 22 pacientes varones (78.6%) y 6 mujeres (21.4%) con una media de edad de 61.9 (DE = 14.1) años y un rango de 24-86 años. De los 28 casos a estudio al inicio de su estancia en UCI, un total de 9 fallecen en las primeras 48 horas de ingreso en la UCI, y a 5 de ellos le dan el alta en la UCI e ingresan en otra planta del hospital. Por lo tanto, solo podemos obtener muestra de 14 pacientes al tercer día de estudio. Hubo dos pacientes que cursaron con anuria, de los cuales, no se obtuvieron muestras de orina, por eso, contamos con 26 muestras de orina procedentes de los casos.

4.1.2. Estudio de las características clínicas en el grupo de casos.

En primer lugar, se hizo un estudio del tipo de infecciones padecidas por los pacientes, de los parámetros clínicos que caracterizan a la sepsis y que presentó esta muestra de pacientes, así como el estudio de la evolución que tuvieron en los primeros tres días de estancia en la UCI. En último lugar, se hizo un estudio de asociaciones observadas entre estos parámetros clínicos.

En cuanto a la causa originaria del *shock* séptico, es decir, al origen de la infección, el 50% fue por una causa abdominal, el 21% fue por una causa urinaria y el 29% por una causa respiratoria. La mayoría de casos presentaron enfermedades subyacentes como enfermedades cardiovasculares, hiperlipidemias, diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, malignidad, etc. Otros dos casos describían procesos de hepatitis B (HBV) y otros presentaban virus como el de la inmunodeficiencia humana (VIH) además de hipotiroidismo. Estas enfermedades pudieron contribuir también a la depleción de antioxidantes. Los microorganismos causantes de las infecciones en estos pacientes fueron: *Acinetobacter*n=1, *Streptococos*n=3, *Pseudomonas*n=1, *Candida Albicans*n=1, *Campylobacter*n=1, *Clostridium*n=1 y el resto fueron *E. coli*.

En cuanto a la gravedad de los pacientes, podemos decir que la mortalidad observada a los 28 días fue del 42.9% (12 pacientes) y las puntuaciones en las escalas de gravedad se encontraron elevadas. La puntuación de APACHE II (rango intercuartílico) fue de 22.5 (17-27) al ingreso. La media de la puntuación de SOFA fue de 12.4 ± 2.6 y 8.9 ± 4.4 al ingreso y al tercer día, respectivamente, de un total de 24 puntos en la escala de gravedad. Todos los casos se encontraban bajo un soporte artificial nutricional enteral o parenteral, no enriquecido con glutamina. Un total de 15 pacientes necesitaron ventilación mecánica (53,6%) y la duración media de la estancia en UCI fue de 7.04 ± 10.5 días. En la **Tabla 10** se detallan estas características junto con otros parámetros respiratorios registrados durante el estudio.

Al considerar la evolución que experimentaron los pacientes, se observaron diferencias significativas entre el primer día y el tercer día de estancia en UCI en parámetros como el SOFA, FiO_2 , ácido láctico y PAM. La significación estadística de estas diferencias se pueden observar en la **Tabla 10**. En el caso del SOFA y de la FiO_2 , se observó una disminución de sus valores a los tres días, y en el caso de la PAM y de los niveles de ácido láctico aumentaron al tercer día. También, otros parámetros como el exceso de bases y el anión GAP aumentaron al tercer día de forma próxima a la significación estadística. En el caso del pH y de los niveles de bicarbonato se observó que disminuyeron los valores al tercer día, pero no de forma significativa.

Tabla 10. Características clínicas y evolución desde la admisión hasta el tercer día en los pacientes críticos con *shock séptico*.

	1° Día (media ± DS) (n = 28)	3° Día (media ± DS) (n = 14)	Valores de referencia	Valor de p Día 1 vs Día 3
APACHE II	22.5 ± 6.9	-	0	-
SOFA	12.4 ± 2.6	8.9 ± 4.4	0	0.011
FiO ₂	0.57 ± 0.18	0.40 ± 0.14	> 0.68 %	0.001
PAM (mmHg)	67.1 ± 15.9	79.6 ± 10.9	70 - 105	0.009
PaO ₂ /FiO ₂	231.5 ± 81.6	240.1 ± 98.9	200 - 300	0.494
PaCO ₂ (mmHg)	40.3 ± 12.4	42.0 ± 9.2	35 - 45	0.360
PEEP (cmH ₂ O)	9.46 ± 2.88	8.17 ± 2.40	2 - 5	0.374
Cst (mL/cmH ₂ O)	47.0 ± 37.0	30.8 ± 6.6	60 - 100	0.630
pH	7.32 ± 0.09	7.38 ± 0.11	7.35 - 7.45	0.266
Bicarbonato (mmol/L)	20.8 ± 6.2	25.2 ± 6.4	21 - 28	0.103
Exceso de bases (mmol/L)	-5.54 ± 5.95	0.54 ± 8.15	-2 - 3	0.064
Anion Gap (mmol/L)	12.1 ± 4.2	7.2 ± 10.8	3 - 11	0.054
Ácido láctico (mmol/L)	4.7 ± 2.0	2.4 ± 2.2	0.6 - 2.5	0.014

p < 0.05 = significación estadística. APACHE II: Evaluación de la fisiología aguda y la salud crónica II. SOFA: Evaluación secuencial de insuficiencia orgánica. FiO₂: Fracción de oxígeno inspirada. PAM: Presión arterial media. PaO₂/FiO₂: Presión parcial de oxígeno arterial / Fracción de oxígeno inspirada. PaCO₂: Presión parcial arterial de dióxido de carbono. PEEP: Presión positiva al final de la espiración. Cst: Complianza.

Para obtener más información acerca de las variables clínicas estudiadas, buscamos asociaciones entre los parámetros de la tabla anterior. Se observó que existía una correlación positiva de la acidemia con la edad objetivado con una significación estadística al asociar el pH vs edad (p=0.022) y el exceso de bases vs edad (p=0.069), donde los pacientes más jóvenes tuvieron un valor más alto de pH y de exceso de bases. En el tercer día también se encontraron correlaciones positivas de la escala SOFA con los días de estancia en UCI (p< 0.002), con los niveles de ácido láctico (p=0.007) y con el FiO₂, este último tanto en el primer día de estancia en UCI (p=0.051) como en el tercero (p=0.048).

Igualmente, se observó una correlación positiva entre la escala de severidad APACHE II y el anión GAP (p< 0.001) al inicio de la estancia en la UCI y en el tercer día se encontró próxima a la significación estadística (p=0.085). También se observó una asociación significativa del APACHE II con el bicarbonato (p=0.035) y con el exceso de bases (p=0.016) en el tercer día. En este caso el bicarbonato y el exceso de bases disminuyeron cuando aumentó el APACHE II. Se encontró además una correlación positiva entre los días de ventilación mecánica y el FiO₂ tanto en el primer día (p=0.016) como en el tercer día (p=0.007) de estancia en la UCI. En cuanto a la

PCO₂, se han observado diversas asociaciones con el SOFA (p=0.007; p=0.051), bicarbonato (p=0.032; p=0.016) y anión GAP (p= 0.054; p=0.040) tanto en el primer como en el tercer día de estancia en UCI, respectivamente. En el caso del bicarbonato y del SOFA, éstos aumentaron cuando aumentó la PCO₂, y en el caso del anión gap, éste disminuyó cuando aumentó la PCO₂. Igualmente se observó una correlación negativa de la PCO₂ con la complianza (p= 0.008) y con el pH (p= 0.048) y positiva con el FiO₂ (p= 0.011) en el primer día. De igual manera, se encontraron asociaciones significativas esperadas del pH, tanto con el bicarbonato (p= 0.015; p= 0.014) como con el exceso de bases (p= 0.003; p= 0.002) en el primer y el tercer día, respectivamente. Esta correlación fue positiva, es decir, aumentó el pH cuando aumentó el bicarbonato y el exceso de bases. El bicarbonato también presentó una correlación positiva con el exceso de bases en el primer (p< 0.001) y en el tercer día (p< 0.001). Por último, observamos una correlación del anión GAP en el tercer día con el bicarbonato (p< 0.001) y con el exceso de bases (p< 0.001), siendo en este caso correlaciones negativas.

4.1.3. Estudio de los parámetros bioquímicos en el grupo casos.

A continuación, se muestran los resultados de los parámetros bioquímicos, hematológicos y urinarios en pacientes críticos tanto en el ingreso como en el tercer día en la UCI (**Tabla 11**), así como una serie de asociaciones observadas entre estas variables. Los valores de referencia que se muestran son los empleados en el laboratorio del Hospital Virgen de las Nieves para los métodos que se utilizan atendiendo a la técnica de referencia utilizada.

En relación a los parámetros estudiados, todos los pacientes críticos cumplieron los criterios clínicos para el diagnóstico de *shock séptico*. En cuanto a los parámetros nutricionales, se observan unos niveles muy bajos de albúmina, prealbúmina y transferrina. Igualmente, tanto los marcadores de insuficiencia renal (creatinina, urea) como los de insuficiencia hepática (GPT, GOT y bilirrubina) se encontraron muy alterados, mostrando valores medios muy por encima de los rangos de referencia. Sin embargo, los iones (sodio y potasio) se mantuvieron dentro de los rangos de referencia.

En cuanto a la coagulación, encontramos alteraciones, ya que observamos tiempos alargados de la TTPA y niveles altos de fibrinógeno. Se obtuvieron parámetros

anormales con niveles medios muy elevados en marcadores agudos de inflamación e infección como la PCR y PCT. De igual manera, otros marcadores de fase aguda como la ferritina y la LDH los encontramos muy elevados. En el caso del hemograma, observamos una leucocitosis con un predominio de polimorfonucleares, es decir, con un mayor porcentaje de neutrófilos tanto en el primer como en el tercer día.

El estudio de evolución de la estancia en UCI, mostró que a los tres días existió una disminución significativa de la PCT, y de parámetros del hemograma como la Hb y las plaquetas, así como una disminución significativa de la GPT. También se encontró un descenso próximo a la significación estadística del INR al tercer día de estancia en la UCI. La evolución comparativa al tercer día se puede observar en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Resultados de los pacientes con *shock* séptico y evolución de las analíticas rutinarias hechas el día de inclusión en el estudio y al tercer día.

	Día 1 (media ± DS) (n = 28)	Día 3 (media ± DS) (n = 14)	Valores de referencia	Valor de p Día 1 vs Día 3
Albúmina (gr/dL)	2.72 ± 0.61	2.66 ± 0.65	3.5 – 5	0.139
Prealbúmina (mg/dL)	12.7 ± 6.7	17.0 ± 10.7	20 – 40	0.143
Ferritina (ng/mL)	678.7 ± 946.6	529.3 ± 450.1	12 - 300	0.707
Transferrina (mg/dL)	139.3 ± 57.1	148.1 ± 51.3	175 - 300	0.514
Creatinina (mg/dL)	2.99 ± 1.47	2.35 ± 1.64	0.67 – 1.20	0.084
Urea (mg/dL)	110.0 ± 65.7	130.8 ± 63.2	10.8 – 38.4	0.210
Diuresis (mL/24h)	1999 ± 1507	2400 ± 1598	1000 - 1500	1.000
Balance hídrico (mL/24 h)	1740 ± 1915	632 ± 1612	1500 – 3500	0.426
Sodio (mmol/L)	137.0 ± 7.2	136.8 ± 8.2	136 - 146	0.589
Potasio (mmol/L)	4.26 ± 0.91	3.93 ± 0.71	3.5 – 5.1	0.850
Cobre (µg/dL)	94.7 ± 29.7	100.8 ± 25.9	70 – 140	0.276
GOT o AST (U/L)	186.4 ± 299.6	964.1 ± 1947.5	5 - 40	0.117
GPT o ALT (U/L)	112.6 ± 128.3	506.4 ± 779.3	13 - 37	0.012
Bilirrubina total (mg/dL)	2.37 ± 3.04	2.79 ± 3.07	0.3 – 1.2	0.975
INR (ratio)	2.01 ± 1.40	1.90 ± 2.39	0.80 – 1.16	0.053
TTPA (sg)	49.19 ± 30.26	40.83 ± 12.37	26 - 37	0.629
Fibrinógeno (mg/dL)	513.8 ± 183.0	514.3 ± 290.4	200 - 350	0.778
Dimero D (ng/mL)	49.6 ± 173.3	51.6 ± 82.0	< 100	0.500
Factor V (U/dL)	73.8 ± 29.4	113.0 ± 53.0	70 - 120	0.116
PCR (mg/L)	35.1 ± 29.0	46.7 ± 53.6	0.02 – 5.00	0.441
Procalcitonina (ng/mL)	75.5 ± 59.3	42.6 ± 66.0	< 0.5	0.018
LDH (U/L)	620.0 ± 473.8	1285.9 ± 2130.7	110 - 295	0.301
CPK (U/L)	2556 ± 11507	7706 ± 29828	40 - 200	0.733
Leucocitos (*10 ³ /µL)	15.3 ± 18.0	13.3 ± 68.4	3.5 – 10.5	0.679
Neutrófilos (%)	84.7 ± 16.2	86.1 ± 6.1	42 - 77	0.233
Hemoglobina (g/dL)	11.25 ± 2.55	9.44 ± 2.11	11 - 17	0.001
Plaquetas (*10 ³ /µL)	122.3 ± 96.0	86.8 ± 59.4	120 - 450	0.033

p < 0.05 = significación estadística. GOT o AST: Aspartato Transaminasa o Glutamato-Oxalacetato Transaminasa. GPT o ALT: Alanina Transaminasa o Glutamato-Piruvato Transaminasa. INR: Ratio Internacional Normalizado. TTPA: Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada. PCR: Proteína C Reactiva. CPK: Creatina quinasa.

A continuación, se exponen las asociaciones encontradas entre las variables medidas en los pacientes con *shock* séptico. Se observó una asociación significativa de la urea con la creatinina ($p < 0.001$; $p < 0.001$) en el primer y tercer día de estancia en UCI, y con el potasio ($p = 0.008$) y la LDH ($p = 0.034$) en el primer día. En los tres casos la urea se aumentó conforme aumentaron la creatinina, el potasio y la LDH.

Al correlacionar las transaminasas se observaron diversas asociaciones. La GOT se asoció de forma positiva con la GPT tanto en el primer ($p < 0.001$) como en el tercer día ($p < 0.001$), también se encontró una asociación con la bilirrubina ($p = 0.027$), con la LDH ($p < 0.001$) y con la TTPA ($p = 0.034$) en el primer día, y con la CPK ($p = 0.019$) en el tercer día. Estas últimas correlaciones también fueron positivas, aumentaron sus valores conforme aumentó el valor de la GOT. Sin embargo, al correlacionar la GOT con el factor V ($p = 0.035$), se encontró una asociación negativa. Seguidamente, encontramos correlaciones entre la GPT con el factor V ($p = 0.012$), con la LDH ($p = 0.008$) y con la CPK ($p = 0.049$) en el primer día de estancia en la UCI, así como con la PCR ($p = 0.020$) en el tercer día. En el caso del factor V, éste aumentó al disminuir la GPT, sin embargo, la LDH, la CPK y la PCR aumentaron al aumentar la GPT.

En el caso de la bilirrubina, los parámetros con lo que se asoció fue con el TTPA ($p < 0.001$) y plaquetas ($p = 0.014$) en el tercer día y con la PCR ($p = 0.006$) en el primer día. La correlación encontrada de la bilirrubina con la TTPA fue positiva y las encontradas con la PCR y plaquetas fueron negativas.

Entre los parámetros de la coagulación se encontraron también asociaciones significativas. Nos encontramos el caso del INR vs factor V ($p < 0.001$) y TTPA vs plaquetas ($p = 0.008$) en el tercer día, ambas correlaciones fueron negativas. El fibrinógeno se asoció con los neutrófilos ($p = 0.038$) en el primer día, y con la creatinina ($p < 0.001$) y la urea ($p = 0.018$) en el primer día. En este caso el fibrinógeno disminuyó al aumentar los neutrófilos, la creatinina y la urea. El factor V de la coagulación se correlacionó de manera negativa con el INR ($p < 0.001$) y con el potasio ($p = 0.022$) en el tercer día.

También se encontró una asociación positiva entre la PCR y la PCT ($p = 0.019$) y otra correlación positiva entre neutrófilos y leucocitos ($p = 0.006$), ambas en el tercer día. Por último, se observó una correlación de la CPK con la LDH ($p = 0.015$) en el tercer

día, y con los neutrófilos ($p= 0.006$) en el primer día, aumentando la CPK con la LDH y disminuyendo la CPK con los neutrófilos.

4.2. Estudio del ácido piroglutámico, ácido glutámico y glutatión peroxidasa.

En este capítulo se muestra la prevalencia que se obtuvo de valores alterados de los niveles de PiroGlu y de Glu y, y la actividad enzimática de GPx, así como el estudio de los niveles en suero y orina en los pacientes y sus diferencias con los controles. Después se muestran los resultados de la evolución que tuvieron dichas magnitudes de estudio en los tres días de estancia en UCI. Seguidamente, se explican las correlaciones encontradas entre estas variables.

4.2.1. Prevalencia, comparación entre casos y controles y evolución de los niveles de ácido piroglutámico, ácido glutámico y glutatión peroxidasa.

Se hizo una estimación de la prevalencia de resultados alterados de los niveles de PiroGlu, de Glu y de la actividad enzimática de la GPx. Esta estimación se calculó a partir de los resultados obtenidos en los controles, los cuales se tomaron como valores de referencia. A partir de aquí, se calculó la prevalencia de resultados anormales en los casos del estudio. La prevalencia que se obtuvo de los niveles de PiroGlu en suero elevado en los casos fue del 85% y 93% en el primer y en el tercer día, respectivamente. La prevalencia de los niveles de PiroGlu/mg de creatinina (PiroGlu/cre) en orina elevada fue del 65% y 100% en el primer y en el tercer día, respectivamente. En cuanto a los niveles de Glu, la prevalencia de resultados por debajo de los rangos de referencia obtenidos fue de un 54% y 7.6% en suero en el primer y tercer día, respectivamente. En el caso de los niveles de Glu en orina fue de un 46% y 8.3% en el caso de Glu/mg de creatinina (Glu/crea). Finalmente, la actividad enzimática de GPx tuvo una prevalencia de niveles bajos de un 86% y, considerando la GPx/Hb de un 90%.

A continuación, se hace un estudio del estado en el que se encuentran los niveles de las moléculas del ciclo gamma-glutamil (PiroGlu, Glu y GPx). La **Tabla 12** muestra los niveles de PiroGlu séricos, PiroGlu/crea en la orina, niveles de Glu en suero y orina, niveles de Se en suero y eritrocito, y la actividad GPx eritrocítica en pacientes con *shock*

séptico en comparación con los controles (individuos sanos). Un total de 28 muestras de orina y suero se utilizaron como controles.

El estudio de la relación entre los parámetros séricos y urinarios, mostró niveles séricos de PiroGlu y PiroGlu/crea en la orina significativamente mayores en los pacientes con *shock* séptico en comparación con los del grupo de controles sanos ($p < 0.001$), tanto al ingreso en UCI como en el tercer día de su estancia. También observamos que los niveles de Glu séricos fueron significativamente menores ($p = 0.003$) en los pacientes con *shock* séptico en comparación con los del grupo control al ingreso en la UCI. Específicamente, en orina, se observaron niveles de Glu significativamente diferentes entre grupos, siendo más bajos en los pacientes con *shock* séptico ($p < 0.001$) tanto en el ingreso como en el tercer día en la UCI.

En relación a los parámetros plasmáticos y eritrocitarios analizados, se observa que la actividad de la GPxeritrocitaria, fue significativamente menor ($p < 0.001$) en pacientes con *shock* séptico en comparación con el grupo control, tanto en el ingreso en UCI como en el tercer día de estancia. Finalmente, los niveles de Se en plasma y eritrocito también se encontraron disminuidos en los pacientes sépticos con respecto a los pacientes control, tanto en el primer día como el tercer día de estancia en UCI.

En cuanto a la evolución en la UCI durante los tres días, se observa que hay un aumento significativo al tercer día en los niveles de PiroGlu/crea en orina. Complementariamente, en el caso de Glu en orina y en la GPx/Hb, se observó un descenso significativo durante la evolución de la estancia en UCI en el grupo de casos.

Tabla 12. Niveles séricos y urinarios de ácido piroglutámico y ácido glutámico, niveles de selenio en eritrocito y en suero, y niveles en eritrocito de glutatión peroxidasa en pacientes con *shock* séptico comparados con controles sanos y la evolución después de tres días.

	Controles (n = 28)	Día 1 Casos (n = 28)	Día 3 Casos (n = 14)	Día 1 Valor de p Casos vs Controles	Día 3 Valor de p Casos vs controles	Valor de p Día 1 Casos vs Día 3 Casos
PiroGlu suero ($\mu\text{g/L}$)	399.9 \pm 77.1	696.7 \pm 273.0	992.3 \pm 442.6	0.001	0.001	0.056
PiroGlu orina ($\mu\text{g/L}$)	400.7 \pm 234.5	522.9 \pm 356.1	1790.3 \pm 431.8	0.381	0.007	0.055
PiroGlu orina ($\mu\text{g/mg}$ creatinina)	0.40 \pm 0.32	2.03 \pm 2.29	3.92 \pm 1.89	0.001	0.001	0.005
Glu suero ($\mu\text{g/L}$)	8.03 \pm 2.73	5.74 \pm 1.66	7.48 \pm 2.26	0.003	0.509	0.103
Glu orina ($\mu\text{g/L}$)	30.3 \pm 15.7	7.1 \pm 4.7	13.2 \pm 6.8	0.001	0.001	0.034
Glu orina ($\mu\text{g/mg}$ creatinina)	0.30 \pm 0.18	0.24 \pm 0.16	0.53 \pm 0.45	0.162	0.471	0.221
Selenio suero ($\mu\text{g/L}$)	76.93 \pm 18.14	56.03 \pm 12.95	41.65 \pm 11.46	0.001	0.001	0.001
Selenio eritrocita rio ($\mu\text{g/L}$)	108.7 \pm 23.3	79.6 \pm 14.9	68.2 \pm 15.1	0.001	0.001	0.001
GPx eritrocitaria (mU/mL)	3980.5 \pm 777.5	1265.3 \pm 661.5	1412.7 \pm 591.4	0.001	0.001	0.182
GPx eritrocitaria (U/gr Hb)	26.5 \pm 5.1	12.2 \pm 6.6	16.2 \pm 8.8	0.001	0.001	0.008

$p < 0.05$ = significación estadística. Ácido piroglutámico: PiroGlu. Ácido glutámico: Glu. Actividad de la glutatión peroxidasa: GPx.

4.2.2. Estudio de asociación entre el ácido glutámico, ácido piroglutámico y glutatión peroxidasa.

A continuación, en la **Tabla 13**, se muestran los resultados referentes al estudio de asociación entre los parámetros anteriormente mencionados **en suero**. Los niveles séricos de PiroGlu mostraron una correlación significativa positiva con los niveles séricos de Glu en el primer día de admisión en UCI ($r = 0.651$, $p=0.001$). Esta correlación entre PiroGlu y Glu en suero se mantuvo al tercer día de estancia en UCI ($r = 0.767$, $p=0.001$). También se pudo observar una correlación positiva entre la GPx/Hb el día 1 y el día 3.

RESULTADOS

Tabla 13. Asociaciones observadas entre los niveles séricos de ácido piroglutámico, el ácido glutámico y la actividad eritrocitaria de la glutatión peroxidasa.

		Día 1 PiroGlu	Día 3 PiroGlu	Día 1 Glu	Día 3 Glu	Día 1 GPx/Hb	Día 3 GPx/Hb
Día 1PiroGlu	r	1.000	0.121	0.651	0.068	- 0.316	- 0.252
	p	-	0.681	0.001	0.817	0.175	0.430
Día 3PiroGlu	r		1.000	0.024	0.767	- 0.126	0.077
	p		-	0.935	0.001	0.697	0.812
Día 1Glu	r			1.000	0.174	- 0.382	- 0.462
	p			-	0.553	0.097	0.131
Día 3Glu	r				1.000	- 0.378	0.028
	p				-	0.226	0.931
Día 1GPx/Hb	r					1.000	0.782
	p					-	0.004
Día 3GPx/Hb	r						1.000
	p						-

r = coeficiente de correlación. p < 0.05 = significación estadística. PiroGlu: Ácido piroglutámico; Glu: ácido glutámico. GPx: Actividad de la glutatión peroxidasa.

De la misma manera, se realizó un estudio de asociación entre estas variables **en orina**. En la **Tabla 14**, se muestran los resultados referentes al estudio de asociación entre los parámetros urinarios de Glu y PiroGlu/crea. Los niveles de PiroGlu/crea en orina mostraron una correlación significativa positiva con los niveles de Glu en la orina (r = 0.490, p= 0.011) en el primer día de estancia en la UCI. En cuanto al resto de combinaciones entre PiroGlu y Glu en orina, no se observaron correlaciones. La actividad GPx de los eritrocitos no mostró ninguna correlación significativa con los niveles de PiroGlu o los niveles de Glu, ni en suero ni tampoco en orina.

Tabla 14. Asociaciones observadas entre los niveles **en orina** de ácido glutámico y ácido piroglutámico/mg creatinina.

		Día 1 PiroGlu/crea	Día 3 PiroGlu/crea	Día 1 Glu	Día 3 Glu
Día 1PiroGlu/crea	r	1.000	0.286	0.490	0.049
	p	-	0.344	0.011	0.873
Día 3PiroGlu/crea	r		1.000	0.154	0.132
	p		-	0.616	0.668
Día 1Glu	r			1.000	0.374
	p			-	0.209
Día 3Glu	r				1.000
	p				-

r = coeficiente de correlación. p < 0.05 = significación estadística. PiroGlu/crea: Ácido piroglutámico/creatinina. Glu: Ácido glutámico. Creatinina: crea

4.2.3. Asociaciones observadas entre niveles en orina y niveles en suero de ácido piroglutámico y de ácido glutámico.

En este caso, realizamos un estudio de la asociación entre los resultados de las variables en suero con los resultados en orina. Pudimos observar que los niveles séricos de PiroGlu mostraron una correlación significativa ($r = 0.476$, $p = 0.014$) con los niveles en orina de PiroGlu/crea en el primer día de estancia en la UCI, siendo esta correlación directamente proporcional. Los resultados se pueden observar en la **Tabla 15**. No se observó ninguna asociación entre el PiroGlu estudiado tanto en suero como en orina al tercer día de estancia en la UCI.

Tabla 15. Asociaciones encontradas entre los niveles de ácido piroglutámico en suero y en orina.

		Día 1 PiroGlu Suero	Día 3 PiroGlu Suero	Día 1 PiroGlu/crea Orina	Día 3 PiroGlu/crea Orina
Día 1 PiroGlu Suero	r	1.000	0.121	0.476	0.236
	p	-	0.681	0.014	0.437
Día 3 PiroGlu Suero	r		1.000	0.103	- 0.170
	p		-	0.725	0.578
Día 1 PiroGlu/crea Orina	r			1.000	0.286
	p			-	0.344
Día 3 PiroGlu/crea Orina	r				1.000
	p				-

r = coeficiente de correlación. $p < 0.05$ = significación estadística. PiroGlu/crea: Ácido piroglutámico/creatinina.

Además, los niveles séricos de Glu mostraron una correlación significativa con los niveles en orina de Glu ($r = 0.573$, $p = 0.002$), los resultados se pueden observar en la **Tabla 16**. Sin embargo, dicha asociación de los niveles de Glu entre suero y orina no se apreciaba en el tercer día de estancia en la UCI.

Tabla 16. Asociaciones encontradas entre los niveles de ácido glutámico en suero y en orina.

		Día 1 Glu Suero	Día 3 Glu Suero	Día 1 Glu Orina	Día 3 Glu Orina
Día 1 Glu Suero	r	1.000	0.174	0.573	0.467
	p	-	0.553	0.002	0.108
Día 3 Glu Suero	r		1.000	0.279	0.346
	p		-	0.334	0.247
Día 1 Glu Orina	r			1.000	0.374
	p			-	0.209
Día 3 Glu Orina	r				1.000
	p				-

r = coeficiente de correlación. $p < 0.05$ = significación estadística. Glu: Ácido glutámico

4.2.4. Asociación de los marcadores de gravedad clínicos con el ácido piroglutámico, ácido glutámico y glutatión peroxidasa.

El estudio de asociación de los marcadores de gravedad clínicos con los niveles de ácido piroglutámico se muestra en la **Tabla 17**. Los marcadores de gravedad clínicos considerados son el APACHE II, SOFA, días de estancia en UCI, días de ventilación mecánica y edad. No se observó ninguna asociación entre los niveles de PiroGlu, tanto en suero como en orina, con las variables cuantitativas relacionadas con la gravedad clínica de los casos.

Tabla 17. Asociaciones estudiadas entre los niveles de ácido piroglutámico y marcadores clínicos de gravedad.

		Día 1 PiroGlu Suero	Día 3 PiroGlu Suero	Día 1 PiroGlu Orina	Día 3 PiroGlu Orina	Día 1 PiroGlu/ crea Orina	Día 3 PiroGlu/ crea Orina
Edad(años)	r	-0.041	0.097	0.020	-0.096	0.001	0.322
	p	0.836	0.742	0.925	0.754	0.996	0.125
Estancia en UCI(días)	r	0.179	0.399	0.109	-0.291	0.148	0.199
	p	0.362	0.158	0.595	0.335	0.472	0.514
Ventilación mecánica (días)	r	0.175	-0.058	0.288	0.203	0.281	0.410
	p	0.374	0.843	0.154	0.505	0.164	0.164
APACHE II	r	-0.147	0.116	-0.204	0.027	-0.019	-0.219
	p	0.494	0.721	0.362	0.936	0.934	0.518
SOFA Día 1	r	-0.099	0.011	-0.066	-0.339	-0.004	-0.183
	p	0.618	0.970	0.750	0.258	0.984	0.549
SOFA Día 3	r	-0.099	0.446	0.157	0.095	0.210	0.125
	p	0.706	0.110	0.561	0.754	0.434	0.684

r = coeficiente de correlación. p < 0.05 = significación estadística. PiroGlu: Ácido piroglutámico. APACHE II: Evaluación de la fisiología aguda y la salud crónica II. SOFA: Evaluación secuencial de insuficiencia orgánica.

De la misma manera, considerando los marcadores de gravedad APACHE II, SOFA, días de estancia en UCI, días de ventilación mecánica y edad se trató de buscar correlaciones con el Glu. Este estudio de asociación de los marcadores de gravedad clínicos con los niveles de Glu se muestra en la **Tabla 18**. Se observó una correlación positiva significativa (p = 0.016) entre los días de ventilación mecánica y los niveles de Glu en suero a la inclusión en el estudio. De la misma manera, otra correlación positiva próxima a la significación estadística (p = 0.051) fue observada entre los días de estancia en UCI y los niveles de Glu en suero el día de inclusión en la UCI. Finalmente,

la escala de severidad APACHE II se asoció positivamente con los niveles de Glu en orina/crea.

Tabla 18. Asociaciones encontradas entre los niveles de ácido glutámico y marcadores clínicos de gravedad.

		Día 1 Glu Suero	Día 3 Glu Suero	Día 1 Glu Orina	Día 3 Glu Orina	Día 1 Glu/crea Orina	Día 3 Glu/crea Orina
Edad (años)	r	- 0,176	0,339	- 0,107	- 0,006	0.110	- 0.085
	p	0,371	0,235	0,602	0,986	0.593	- 0.027
Estancia en UCI(Días)	r	0,372	0,385	0,196	- 0,399	0.145	0.183
	p	0,051	0,174	0,336	0,177	0.478	0.550
Ventilación mecánica(Días)	r	0,450	0,107	0,184	0,063	0.122	0.030
	p	0,016	0,715	0,368	0,838	0.553	0.923
APACHE II	r	0,081	0,469	0,306	- 0,005	0.536	0.018
	p	0,707	0,124	0,166	0,989	0.010	0.958
SOFADía 1	r	- 0,041	- 0,052	0,101	- 0,325	0.150	- 0.020
	p	0,835	0,861	0,622	0,279	0.465	0.949
SOFADía 3	r	0,085	0,386	0,098	- 0,164	0.007	- 0.223
	p	0,745	0,173	0,719	0,592	0.978	0.465

r = coeficiente de correlación. p< 0.05 = significación estadística. PiroGlu: Ácido piroglutámico. Glu: Ácido glutámico. Crea: creatinina. APACHE II: Evaluación de la fisiología aguda y la salud crónica II. SOFA: Evaluación secuencial de insuficiencia orgánica.

El estudio de asociación de los marcadores de gravedad clínicos (APACHE II, SOFA, días de estancia en UCI, días de ventilación mecánica y edad) con la actividad de la GPx en eritrocito se muestra en la **Tabla 19**. No se observó ninguna asociación entre la actividad de la GPx en eritrocito con las variables cuantitativas relacionadas con la gravedad clínica de los casos.

Tabla 19. Asociación entre de la actividad de la glutatión peroxidasa con marcadores clínicos de gravedad.

		Día 1 GPx	Día 3 GPx
Edad (años)	r	0.178	- 0.144
	p	0.454	0.656
Estancia en UCI (días)	r	- 0.259	0.282
	p	0.269	0.374
Ventilación mecánica (días)	r	- 0.196	- 0.554
	p	0.408	0.062
APACHE II	r	0.243	- 0.018
	p	0.317	0.958
SOFADía 1	r	- 0.047	- 0.435
	p	0.843	0.158
SOFADía 3	r	0.223	0.200
	p	0.444	0.532

r = coeficiente de correlación. p< 0.05 = significación estadística. GPx: Actividad de la glutatión peroxidasa. APACHE II: Evaluación de la fisiología aguda y la salud crónica II. SOFA: Evaluación secuencial de insuficiencia orgánica.

4.2.5. Asociación de los niveles de ácido piroglutámico, ácido glutámico y glutatión peroxidasa con la mortalidad.

En este subapartado se pretende observar si existió alguna diferencia en los valores de alguno de estos tres parámetros entre pacientes fallecidos y no fallecidos. La **Tabla 20**, muestra los valores medios de ácido piroglutámico y ácido glutámico, tanto en suero como en orina, así como la actividad de la GPx atendiendo a la supervivencia y exitus de los pacientes. La mortalidad observada en este grupo de pacientes a los 28 días fue del 42.9% (12 pacientes). Como se puede observar en la **Tabla 20**, no se registraron diferencias entre los grupos de fallecidos y no fallecidos con los parámetros estudiados, excepto con el Glu/crea en orina en el tercer día.

Tabla 20. Asociaciones estudiadas de los niveles de ácido piroglutámico, ácido glutámico y GPx, entre los pacientes fallecidos y supervivientes.

Parámetro	Día 1		Día 3		Día 1 p Valor	Día 3 p Valor
	NO Media (DE)	SI Media (DE)	NO Media (DE)	SI Media (DE)		
PiroGluSuero	703.6	684.3	873.11	1429.1	0.577	0.186
PiroGluOrina	1002.0	494.2	1399.4	3093.0	0.792	0.128
PiroGlu/creOrina	2.29	1.60	4.05	3.50	0.673	0.612
GluSuero	5.89	5.55	6.89	9.64	0.745	0.073
GluOrina	7.582	20.61	12.35	15.86	0.398	0.493
Glu/creaOrina	0.025	0.069	0.063	0.017	0.493	0.043
GPxeritrocitaria	1289.6	1214.8	1451.8	1230.3	0.732	0.518
GPx/Hberitrocitaria	12.06	12.38	17.06	13.70	0.732	0.405

PiroGlu: Ácido piroglutámico. Glu: Ácido glutámico. GPx: Glutatión peroxidasa. Crea: creatinina. Hb: Hemoglobina.

4.2.6. Asociación de los niveles de ácido piroglutámico, ácido glutámico y glutatión peroxidasa con parámetros hematológicos, respiratorios y bioquímicos.

A continuación, se realiza un análisis de las asociaciones existentes de los tres parámetros de estudio (PiroGlu, Glu y GPx) con los parámetros respiratorios, bioquímicos y hematológicos que se miden rutinariamente durante la estancia en UCI y anteriormente mencionadas.

Se realizó un estudio de las asociaciones de los niveles de **PiroGlu** con los parámetros utilizados como marcadores de inflamación, tanto en suero como en orina.

Los marcadores de inflamación utilizados fueron el ácido láctico, fibrinógeno, LDH, PCT, PCR y leucocitos. Se observó una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de PiroGlu en suero y los niveles de PCT, el día de inclusión en el estudio ($r = -0.416$; $p = 0.034$). Los niveles de PiroGlu disminuyeron al aumentar la PCT.

Cuando se asociaron las variables respiratorias PAM, pH, PaFi, PaCO₂, PEEP, complianza, FiO₂, bicarbonato, exceso de bases y anión GAP con los niveles de PiroGlu en suero y orina, también se encontraron correlaciones. Se observa una correlación positiva entre la concentración de PiroGlu en orina con la PaCO₂ ($r = 0.593$; $p = 0.003$), el primer día. Esta correlación fue positiva, aumentó el PiroGlu conforme aumentó la presión parcial de CO₂. También se observa una correlación positiva de los niveles de PiroGlu/crea en orina con el FiO₂ ($r = 0.540$; $p = 0.005$).

También se asociaron otras variables bioquímicas y hematológicas como la creatinina, urea, diuresis, balance hídrico, sodio, potasio, GOT, GPT, bilirrubina, CPK, INR, APTT, dímero D, factor coagulación V, leucocitos, neutrófilos, hemoglobina y plaquetas, con los niveles de PiroGlu en suero y en orina. Se observaron una serie de correlaciones en el primer día. Estas correlaciones fueron los niveles de PiroGlu en suero con los niveles de creatinina en suero ($r = -0.472$; $p = 0.011$), los niveles de PiroGlu en suero con TTPA ($r = -0.587$; $p = 0.001$) y los niveles de PiroGlu en orina con el porcentaje de neutrófilos ($r = -0.431$; $p = 0.04$). Estas tres correlaciones fueron negativas, ya que al aumentar los niveles de PiroGlu disminuyó la concentración de creatinina, la TTPA y el porcentaje de neutrófilos. También en el primer día se observaron otras asociaciones, los niveles de PiroGlu/creatinina en orina con sodio en suero ($r = 0.380$; $p = 0.056$) y los niveles de PiroGlu en orina con porcentaje de linfocitos ($r = 0.431$; $p = 0.040$), siendo estas correlaciones positivas, ya que al aumentar los niveles de PiroGlu también aumentaron los niveles de sodio y el porcentaje de linfocitos. También se observaron correlaciones al tercer día como son los niveles de PiroGlu en suero con diuresis ($r = 0.643$; $p = 0.018$) y los niveles de PiroGlu/creatinina en orina con balance hídrico ($r = 0.818$; $p = 0.001$), siendo en este caso una correlación positiva.

Posteriormente, se realizó un análisis de las asociaciones de los niveles de **Glu**, tanto en suero como en orina, con las variables respiratorias, bioquímicas y hematológicas cuantitativas. Se comenzó asociando los niveles de Glu con los

marcadores de inflamación como el ácido láctico, fibrinógeno, LDH, PCT, PCR y leucocitos. Se observaron dos correlaciones negativas que consisten en asociar los niveles de Glu en suero con los niveles de LDH, en el primer día ($r = -0.459$; $p = 0.016$) y los niveles de Glu en orina con los niveles de LDH en el tercer día ($r = -0.608$; $p = 0.036$).

En cuanto a la asociación de los niveles de Glu con los marcadores respiratorios también se encontraron correlaciones significativas. Los marcadores respiratorios estudiados fueron PAM, pH, PaFi, PaCO₂, PEEP, complianza, FiO₂, bicarbonato, exceso de bases y anión GAP. Se observó una correlación entre los niveles de Glu en orina con la PaCO₂ ($r = 0.474$; $p = 0.022$) y también entre los niveles de Glu en orina con el FiO₂ ($r = 0.504$; $p = 0.010$), en el primer día. Estas dos últimas correlaciones fueron positivas.

Seguidamente, se hizo un estudio de los marcadores bioquímicos y hematológicos con los niveles de Glu en suero y orina, en los cuáles también observamos algunas correlaciones significativas. Las variables que se estudiaron en este caso fueron creatinina, urea, diuresis, balance hídrico, sodio, potasio, GOT, GPT, bilirrubina, CPK, INR, APTT, dímero D, factor coagulación V, leucocitos, neutrófilos, hemoglobina y plaquetas. Se observaron las siguientes correlaciones: los niveles de Glu en suero y los niveles de GOT ($r = -0.418$; $p = 0.038$), los niveles de Glu en suero y APTT ($r = -0.566$; $p = 0.002$), los niveles de Glu en orina y APTT ($r = -0.377$; $p = 0.058$), en el primer día. Los niveles de Glu en suero y el recuento de plaquetas ($r = -0.582$; $p = 0.029$), en el tercer día. Estas cuatro correlaciones últimas fueron negativas.

Por último, se estudiaron las asociaciones de la actividad enzimática de la GPx en eritrocito con las variables respiratorias, bioquímicas y hematológicas. Al hacer la asociación de la actividad enzimática de GPx con los marcadores inflamatorios como el ácido láctico, fibrinógeno, LDH, PCT, PCR y leucocitos, se observó una correlación entre la actividad enzimática de la GPx y los niveles de lactato ($r = -0.487$; $p = 0.029$), en el primer día. Se observó cómo la actividad de la GPx disminuye al aumentar los niveles de ácido láctico.

También se hizo un estudio de asociación entre la actividad enzimática de la GPx con marcadores respiratorios como la PAM, pH, PaFi, PaCO₂, PEEP, complianza, FiO₂, bicarbonato, exceso de bases y anión GAP. En este caso, se observó una correlación

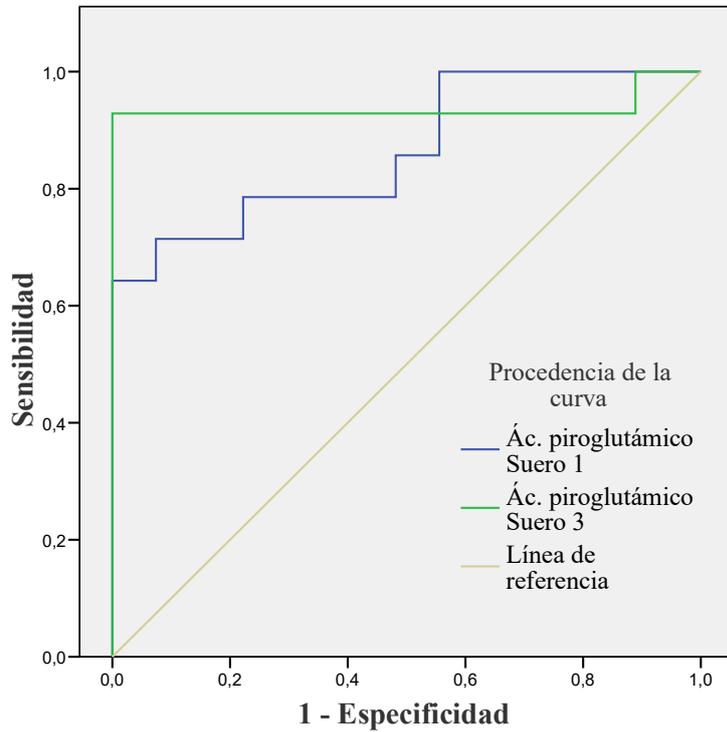
entre la actividad de la GPx y el pH ($r = - 0.615$; $p = 0.044$), la actividad enzimática de la GPx y los niveles de bicarbonato ($r = - 0.636$; $p = 0.035$) y la actividad enzimática de la GPx y exceso de bases ($r = - 0.742$; $p = 0.014$), en el tercer día. Estas tres correlaciones últimas fueron negativas. La actividad enzimática de la GPx disminuyó al aumentar el pH, el bicarbonato y el exceso de bases.

En cuanto a la asociación estudiada de la actividad enzimática de la GPx con los marcadores bioquímicos y hematológicos tenemos en cuenta los niveles de la creatinina, urea, diuresis, balance hídrico, sodio, potasio, GOT, GPT, bilirrubina, CPK, INR, APTT, Dímero D, Factor coagulación V, leucocitos, neutrófilos, hemoglobina y plaquetas. En este caso solo se observó una correlación positiva entre la GPx y la PCR ($r = 0.829$; $p = 0.042$), en el tercer día, donde aumentó la actividad enzimática de la GPx al aumentar los niveles de PCR.

4.2.7. Curvas ROC según los niveles de ácido piroglutámico, ácido glutámico y glutatión peroxidasa.

A continuación, se realizó un cálculo de la curva ROC (**Figura 9**) para determinar la utilidad de los niveles de PiroGlu en suero en el diagnóstico de sepsis en el primer y el tercer día de estancia en la UCI. Se observa que la curva se encuentra medianamente alejada de la línea de referencia.

Figura 9. Curva ROC del ácido piroglutámico.



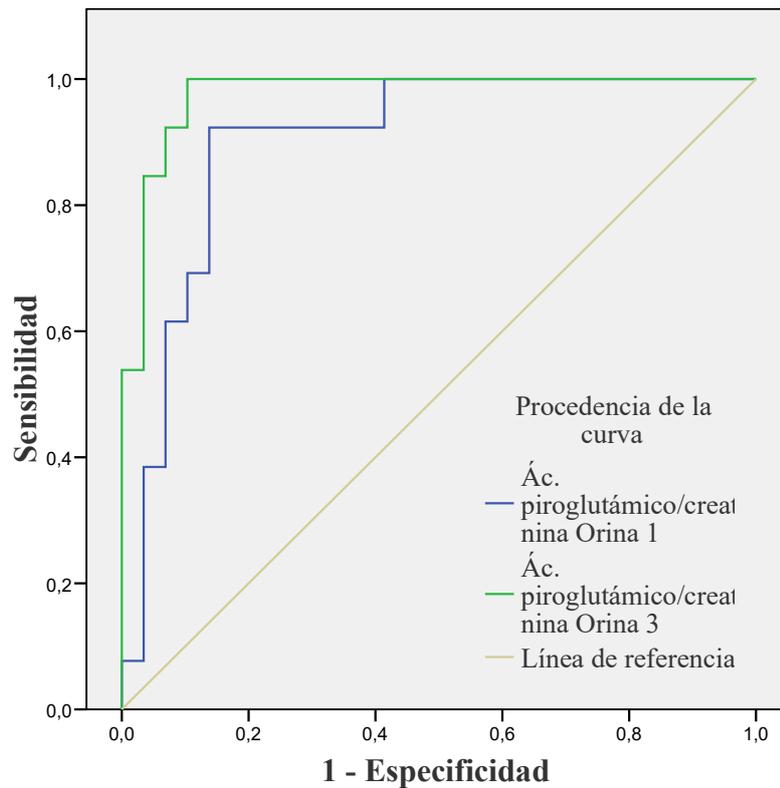
En la curva establecimos un punto de corte de 460 $\mu\text{g/L}$ dónde la sensibilidad, la especificidad y el Área bajo la curva (ABC) eran medianamente altas (**Tabla 21**).

Tabla 21. Sensibilidad, especificidad y ABC del ácido piroglutámico.

	Sensibilidad	Especificidad	ABC
Día 1 Ácido piroglutámico	0.786	0.778	0.865
Día 3 Ácido piroglutámico	0.929	0.778	0.937

De la misma manera se hizo la curva ROC de PiroGlu/crea en orina (**Figura 10**). Y se observó que la curva se aleja de la línea de referencia.

Figura 10. Curva ROC del ácido piroglutámico/creatinina en orina.



Con el punto de corte de 0.5 µg/L se obtuvieron las sensibilidades, especificidades y el ABC del PiroGlu/crea en orina en el primer y en el tercer día (**Tabla 22**).

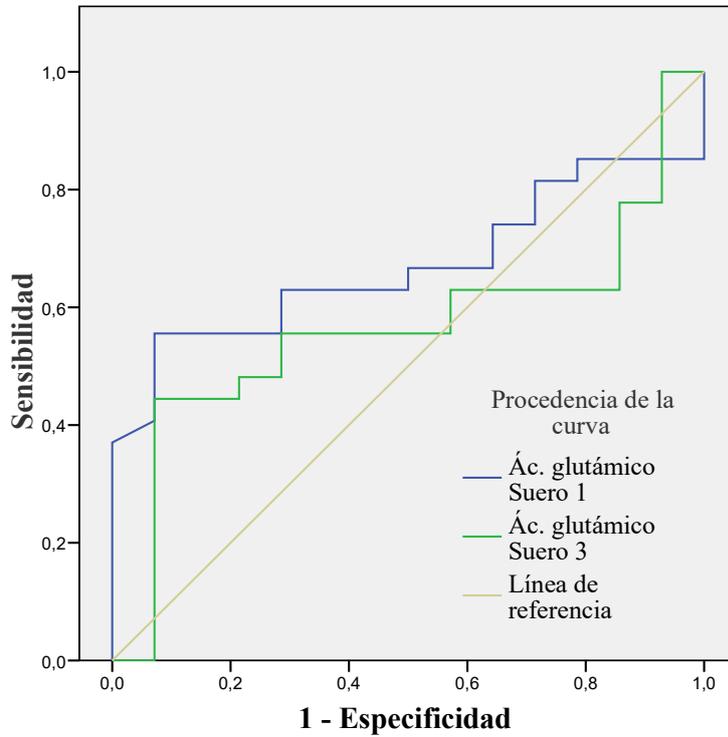
Tabla 22. Sensibilidad, especificidad y ABC de ácido piroglutámico/creatinina en orina.

	Sensibilidad	Especificidad	ABC
Día 1 PiroGlu/crea	0.923	0.828	0.902
Día 3 PiroGlu/crea	0.999	0.828	0.976

PiroGlu/crea: Ácido piroglutámico/creatinina

Seguidamente, se hizo un cálculo de la curva ROC del Glu (**Figura 11**), para ver si los niveles de éste discernían entre los pacientes con *shock* séptico y los pacientes sanos. Se calculó la curva inversa, ya que en este caso los pacientes con *shock* séptico tienen niveles bajos de Glu en suero. Pero la curva se muestra cercana a la línea de referencia.

Figura 11. Curva ROC del ácido glutámico en suero.

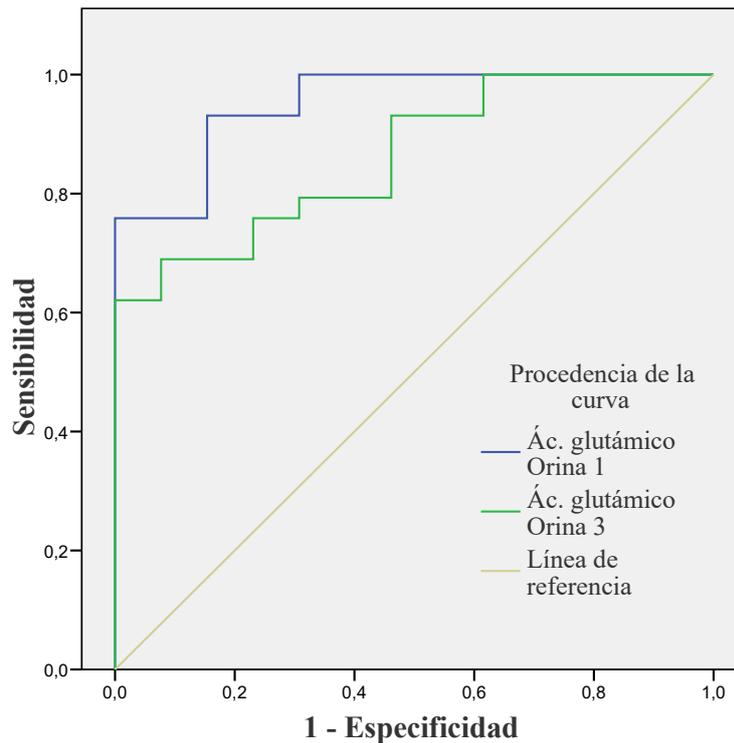


Con el punto de corte de 7 $\mu\text{g/L}$ se obtuvieron las sensibilidades y especificidades del Glu en suero (**Tabla 23**). En este caso, el ácido glutámico apenas mostró sensibilidad y especificidad frente al *shock* séptico y la ABC fue baja.

Tabla 23. Sensibilidad, especificidad y ABC del ácido glutámico en suero.

	Sensibilidad	Especificidad	ABC
Día 1 Ácido glutámico	0.630	0.571	0.671
Día 3 Ácido glutámico	0.630	0.429	0.563

También se hizo un cálculo de la curva ROC del Glu en orina (**Figura 12**), para ver si sus niveles diferenciaban entre los pacientes con *shock* séptico y los pacientes sanos. En este caso también se calculó la curva inversa.

Figura 12. Curva ROC del ácido glutámico en orina.

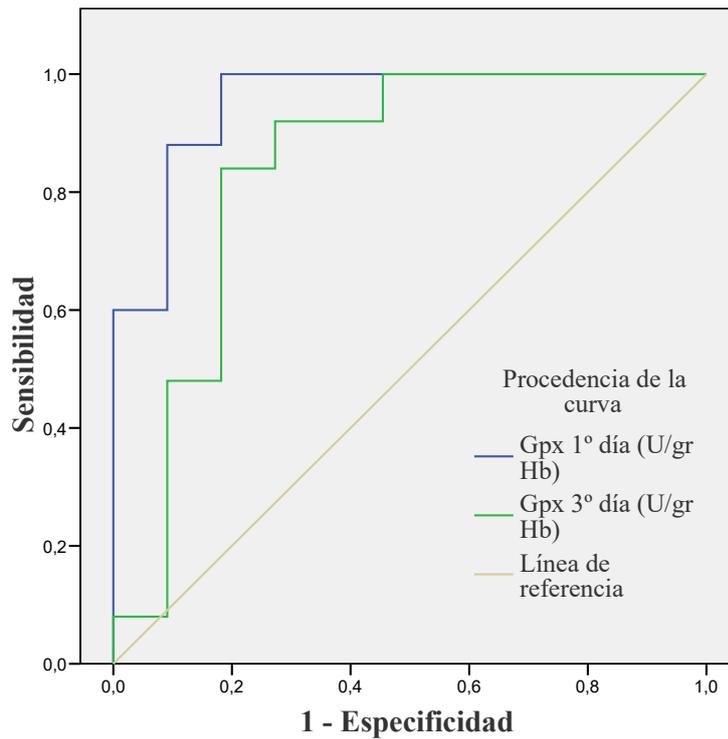
Se calculó la sensibilidad y la especificidad teniendo en cuenta el punto de corte de 14 $\mu\text{g/L}$ se obtuvieron las sensibilidades y especificidades del Glu en orina que se observan en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Sensibilidad, especificidad y ABC del ácido glutámico en orina.

	Sensibilidad	Especificidad	ABC
Día 1 Ácido glutámico orina	0.793	0.846	0.952
Día 3 Ácido glutámico orina	0.793	0.692	0.753

Posteriormente, se hizo lo mismo para la actividad enzimática de la GPx/Hb en eritrocito. Se calculó una curva ROC inversa que se puede observar en la **Figura 13**. En este caso se observa la línea de la curva alejada de la curva de referencia.

Figura 13. Curva ROC de la actividad de la glutatión peroxidasa en eritrocito/hemoglobina.



Gpx/Hb: actividad de la Glutatión peroxidasa eritrocitaria

Se calculó la sensibilidad, la especificidad y el ABC teniendo en cuenta el punto de corte de 15 µg/L de la actividad de la GPx/Hb eritrocitaria cómo se puede observar en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Sensibilidad, especificidad y ABC de la actividad de la glutatión peroxidasa/hemoglobina en eritrocito.

	Sensibilidad	Especificidad	ABC
Día 1 GPx/Hb	880	818	953
Día 3 GPx/Hb	920	727	840

GPx/Hb: Actividad de la glutatión peroxidasa/hemoglobina en eritrocito.

4.2.8. Estudio de la capacidad antioxidante total.

A continuación, se exponen los resultados obtenidos al medir los niveles de la CAT en suero y en orina en los pacientes con *shock* séptico, la comparación con los

controles y su evolución en los tres primeros días de estancia en la UCI. Posteriormente, se presentan los estudios de asociación realizados con otras variables.

Los resultados que se obtuvieron de los niveles de la CAT en suero y orina de los pacientes con *shock* séptico se muestran en la **Tabla 26**. Se puede observar cómo los valores en orina son superiores a los valores en suero.

Tabla 26. Resultados de la capacidad antioxidante total en suero y orina en pacientes con *shock* séptico.

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
Día 1 CAT suero (μmol/L)	363.6	4668.9	1946.2	868.0
Día 3 CAT suero (μmol/L)	625.4	2698.1	1527.7	662.7
Día 1 CAT orina (μmol/L)	2007.2	17395.6	6640.3	4023.5
Día 3 CAT orina (μmol/L)	1483.6	19286.5	7480.5	5314.7

CAT: Capacidad antioxidante total

Se hizo una comparación de los niveles de la CAT entre los pacientes con *shock* séptico y los controles, tanto en suero como en orina, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Otro resultado obtenido fue una correlación significativa entre los niveles de la CAT en suero y los niveles de la CAT en orina ($r = 0.399$; $p < 0.044$), el primer día de estancia en la UCI.

Seguidamente, se estudió la evolución de los niveles de CAT desde el primer día de estancia en la UCI hasta el tercer día, pero tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en suero, ni tampoco en orina.

A continuación, se expone el estudio de asociación entre los niveles de la CAT en suero y orina y las variables anteriormente estudiadas. El PiroGlu y Glu tanto en suero como en orina, y la GPx en eritrocito. Se observó una correlación positiva entre los niveles de la CAT en orina con los niveles de PiroGlu en orina, en el primer día ($r = 0.575$; $p = 0.002$) y en el tercer día ($r = 0.901$; $p = 0.001$). También se observó una correlación positiva entre los niveles de la CAT en orina con los niveles de Glu en orina, en el primer día ($r = 0.469$; $p = 0.016$) y en el tercer día ($r = 0.637$; $p = 0.019$). En los dos casos los niveles de la CAT aumentaron en orina cuando aumentaron los niveles de PiroGlu y los niveles de Glu en orina. Sin embargo, con la actividad enzimática de la GPx no se encontró ninguna asociación. Estas correlaciones se pueden observar en la **Tabla 27**.

RESULTADOS

Tabla 27. Estudio de la asociación de la capacidad antioxidante total con el PiroGlu y el Glu en orina.

		Día 1	Día 3	Día 1	Día 3
		PiroGlu orina	PiroGlu orina	Glu orina	Glu orina
CAT orina Día 1 ($\mu\text{mol/L}$)	r	0.575	- 0.303	0.469	- 0.072
	p	0.002	0.315	0.016	0.816
CAT orina Día 3 ($\mu\text{mol/L}$)	r	0.005	0.901	0.071	0.698
	p	0.986	0.001	0.817	0.001

r = coeficiente de correlación. $p < 0.05$ = significación estadística. CAT: Capacidad antioxidante total. PiroGlu: Ácido piroglutámico. Glu: Ácido glutámico.

Posteriormente, se hizo una comparación de los niveles de la CAT, tanto en suero como en orina, con las variables cuantitativas relacionadas con la gravedad clínica (edad, días de ventilación mecánica, días de estancia en UCI, APACHE II y SOFA) de los casos con *shock* séptico. Entre los resultados obtenidos, se observó una correlación de los niveles de la CAT en suero con la escala APACHE II ($r = 0.447$; $p = 0.028$) y con la edad ($r = 0.401$; $p = 0.035$), donde los niveles de la CAT aumentaron al aumentar la escala APACHE II y la edad. Se observa también una correlación de los niveles de la CAT en orina con los días de ventilación mecánica ($r = 0.584$; $p = 0.002$) que también resultó ser positiva. Los resultados de estas asociaciones se pueden ver en la **Tabla 28**.

Tabla 28. Asociaciones entre los niveles de la capacidad antioxidante total y los marcadores clínicos de gravedad.

		Día 1	Día 3	Día 1	Día 3
		CAT Suero	CAT Suero	CAT Orina	CAT Orina
Edad (años)	r	0.401	0.119	0.283	- 0.006
	p	0.035	0.685	0.161	0.986
Estancia en UCI (días)	r	- 0.037	0.517	0.085	- 0.233
	p	0.852	0.058	0.680	0.444
Ventilación mecánica (días)	r	0.215	0.127	0.584	0.197
	p	0.272	0.666	0.002	0.518
APACHEII	r	0.447	- 0.560	0.203	0.001
	p	0.028	0.058	0.366	1.000
SOFA Día 1	r	0.340	0.135	0.344	- 0.260
	p	0.077	0.646	0.085	0.392
SOFA Día 3	r	- 0.161	0.333	0.162	0.303
	p	0.537	0.245	0.550	0.314

r = coeficiente de correlación. $p < 0.05$ = significación estadística. CAT: Capacidad antioxidante total.

También se estudiaron las diferencias de los niveles de la CAT entre los sujetos fallecidos y los no fallecidos. Se observó una asociación de los niveles de la CAT en suero con la mortalidad en el primer día de estancia en la UCI ($p = 0.045$).

A continuación, se realizó un estudio de los niveles de la CAT, tanto en suero como en orina, con las variables respiratorias, bioquímicas y hematológicas en busca de asociaciones. En primer lugar, se realizó la búsqueda de la asociación de los niveles de la CAT con los marcadores de inflamación (ácido láctico, fibrinógeno, LDH, PCT, PCR y leucocitos). Tras el estudio de asociación las correlaciones observadas fueron los niveles de CAT en suero con los niveles de LDH ($r = 0.447$; $p = 0.019$), en el primer día, que resultó ser positiva, otra correlación de los niveles de la CAT en orina con los niveles de ácido láctico ($r = 0.692$; $p = 0.013$) y otra de los niveles de la CAT en suero con los niveles de fibrinógeno ($r = -0.698$; $p = 0.008$), las dos correlaciones en el tercer día. En el caso los niveles de ácido láctico la correlación es positiva con los niveles de la CAT y, en el caso de los niveles de fibrinógeno, la correlación es negativa, es decir, aumentaron los niveles de fibrinógeno al disminuir los niveles de la CAT.

En cuanto a los marcadores respiratorios, se realizó una asociación con los niveles de la CAT obteniéndose también correlaciones. Los marcadores respiratorios fueron la PAM, pH, PaFi, PaCO₂, PEEP, complianza, FiO₂, bicarbonato, exceso de bases y anión GAP. Se observan 3 correlaciones positivas de los niveles de la CAT en orina el primer día con la PaCO₂ ($r = 0.517$; $p = 0.012$), la PEEP ($r = 0.667$; $p = 0.025$) y la FiO₂ ($r = 0.474$; $p = 0.017$). También se observan dos correlaciones de los niveles de la CAT en suero en el primer día, con el pH ($r = -0.443$; $p = 0.018$) y con el exceso de bases ($r = -0.397$; $p < 0.040$), en este caso negativas, aumentando el pH y el exceso de bases al disminuir los niveles de la CAT.

Por último, se estudió la asociación de los niveles de la CAT con los marcadores bioquímicos: creatinina, urea, diuresis, balance hídrico, sodio, potasio, GOT, GPT, bilirrubina, CPK, INR, APTT, dímero D, Factor coagulación V, leucocitos, neutrófilos, hemoglobina y plaquetas. Se observó una correlación entre los niveles de la CAT en suero y los niveles de creatinina en suero, en el primer día ($r = 0.405$; $p = 0.033$) y en el tercer día ($r = 0.532$; $p = 0.050$), que fue positiva. También una correlación positiva entre los niveles de la CAT en suero y los niveles de urea en suero, tanto en el primer día ($r = 0.509$; $p = 0.006$), como en el tercero ($r = 0.727$; $p = 0.003$). Por otro lado, se observó una correlación entre los niveles de la CAT en orina y los niveles de dímero D ($r = -0.569$; $p = 0.027$), en el primer día, en este caso los niveles de dímero D aumentaron al disminuir los niveles de la CAT.

4.3. Estatus del ácido fólico, la vitamina B12 y la vitamina D en el paciente crítico.

4.3.1. Comparación con controles y evolución de los niveles de ácido fólico, la vitamina B12 y la vitamina D durante la estancia en UCI.

A continuación, se realizó un estudio de los niveles séricos del Fol, de la Vit B12 y de la Vit D en pacientes con *shock* séptico y se compararon con los valores de los controles sanos. Después se estudió la evolución que siguen esos parámetros en la UCI durante tres días. Los niveles de IL-6 fue incluida en este estudio para comparar el comportamiento de este biomarcador de sepsis con las tres vitaminas a estudio.

En la **Tabla 29** se muestran los valores medios de Fol, Vit B12 y Vit D en los pacientes críticos con *shock* séptico. Los valores medios fueron comparados con valores de referencia tomados del grupo de controles sanos. Los resultados sobre los parámetros analizados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) tanto para los niveles de Fol, de Vit B12, de IL-6 y de Vit D entre casos y controles. En el caso de la Vit B12 y la IL-6 se observaron niveles medios superiores en comparación con los controles. Sin embargo, en el caso de los niveles de Vit D se observaron niveles medios de esta vitamina inferiores respecto a los controles.

En el caso de los niveles de Fol, existieron diferencias significativas entre los grupos. Los niveles de Fol fueron inicialmente más elevados en el grupo de los casos en el primer día de estancia en UCI. Se observó que el 28.6% de los pacientes presentaron niveles altos de Fol, frente al 10.7% que mostraron niveles deficientes para esta vitamina. Sin embargo, se observaron unos valores disminuidos del Fol en los casos en el tercer día de estancia en la UCI, al contrario que el primer día.

Tabla 29. Ácido fólico, vitamina B12, interleucina-6 y vitamina D en pacientes con *shock* séptico con respecto a los pacientes sanos.

	Controles (n = 84) (Media ± DE)	Día 1 Casos (n = 28) (Media ± DE)	Día 3 Casos (n = 14) (Media ± DE)	Control vs Casos Día 1	Control vs Casos Día 3	Casos Día 1 vs Casos Día 3
Ácidofólico (ng/mL)	8.71 ± 3.16	9.61 ± 7.86	7.49 ± 7.08	0.047	0.004	0.279
Vitamina B12 (pg/mL)	466.0± 152.2	976.4 ± 511.0	1118.7 ± 192.2	0.001	0.001	0.241
Interleucina-6 (pg/mL)	0.28 ± 0.51	17621 ± 46238	545 ± 1366	0.001	0.001	0.005
Vitamin D (ng/mL)	27.6 ± 18.1	11.9 ± 11.1	8 ± 4.2	0.001	0.001	0.363

p < 0.05 = significación estadística.

El estudio comparativo sobre la evolución en el grupo de casos mostró una disminución significativa de los niveles de IL-6 en el tercer día de estancia en UCI respecto a los valores registrados en la admisión. No se observaron diferencias para ninguna de las vitaminas estudiadas entre el primer y el tercer día de estancia a pesar de que los niveles de Fol y de Vit D al tercer día se encontraron más disminuidos que al primer día.

4.3.2. Asociación entre el estatus de vitaminas (ácido fólico, la vitamina B12 y la vitamina D) e inflamación (IL-6) con los parámetros de gravedad y mortalidad.

En este subapartado se muestra la relación que se encontró entre los parámetros nutricionales correspondientes a los niveles de Fol, Vit B12, Vit D, e inflamación mediante el estatus de IL-6, con la gravedad y la mortalidad de los pacientes. Los parámetros de gravedad que se tuvieron en cuenta fueron edad, días de ventilación mecánica, estancia en UCI, APACHE II, y SOFA.

La **Tabla 30** muestra el análisis de correlación bivariado entre los niveles de Fol, Vit B12, Vit D e IL-6 en función de la gravedad y la mortalidad del paciente crítico. Como se puede observar se encontró una correlación entre los niveles de Fol con los días de ventilación mecánica ($r = 0.459$; $p = 0.014$) en el primer día. Esta correlación fue positiva, es decir, los niveles de Fol aumentaron conforme aumentaron los días de ventilación mecánica. Además, se encontró una asociación de los niveles de IL-6 con el SOFA en el primer día próximo a la significación estadística ($r = 0.363$; $p < 0.075$) y en el tercer día de forma significativa ($r = 0.599$; $p < 0.023$). Los niveles de IL-6 estuvieron más elevados conforme se encontraba elevada la escala SOFA. En los niveles de los demás parámetros, es decir, en los niveles de Vit B12 y en de Vit D, no se observaron asociaciones con la gravedad.

Tabla 30. Asociaciones estudiadas entre los niveles de ácido fólico, vitamina B12 y vitamina D con los marcadores clínicos de gravedad.

		Día 1 Fol	Día 3 Fol	Día 1 Vit B12	Día 3 Vit B12	Día 1 Vit D	Día 3 Vit D	Día 1 IL-6	Día 3 IL-6
Edad(años)	r	0.329	0.053	- 0.199	- 0.005	- 0.038	0.289	- 0.060	0.055
	p	0.088	0.858	0.311	0.907	0.846	0.317	777	0.852
Estancia en UCI(días)	r	- 0.063	0.285	0.301	0.407	- 0.177	0.174	- 0.161	0.425
	p	0.750	0.323	0.119	0.149	0.367	0.553	0.443	0.129
Ventilación mecánica(días)	r	0.459	0.071	0.170	0.036	0.009	0.339	0.129	0.205
	p	0.014	0.810	0.386	0.902	0.966	0.236	0.540	0.483
APACHE II	r	0.310	- 0.130	0.332	0.507	0.008	0.053	0.320	- 0.081
	p	0.140	0.688	0.113	0.093	0.972	0.871	0.158	0.803
SOFA Día 1	r	0.131	0.168	0.315	0.367	0.112	0.225	0.363	0.126
	p	0.506	0.565	0.103	0.197	0.569	0.440	0.075	0.668
SOFA Día 3	r	0.190	0.297	0.044	0.495	- 0.086	0.482	0.315	0.599
	p	0.466	0.302	0.866	0.072	0.742	0.081	0.217	0.023

r = coeficiente de correlación. p < 0.05 = significación estadística. Fol: Ácido fólico. Vit B12: Vitamina B12. Vit D: Vitamina D. IL-6: Interleucina-6.

Posteriormente, se realizó un estudio donde se compararon los niveles de Fol, Vit B12 y Vit D con la mortalidad a los 28 días. Se observó una asociación de los niveles de Fol con la mortalidad (p = 0.017). También se observó una asociación con la mortalidad de la Vit D en el tercer día de estancia en UCI. En ambos casos, los pacientes que fallecieron tuvieron niveles más altos de Fol y de Vit D. Estas asociaciones se pueden observar en la **Tabla 31**. En dicha tabla, también se muestran otras variables que resultaron ser significativas con la mortalidad, algunas de las cuáles (ácido láctico e IL-6) son biomarcadores de gravedad por excelencia. En cuanto a los niveles de IL-6, también se observó diferencias estadísticamente significativas entre los fallecidos y no fallecidos en el primer día (p = 0.008) y en el tercer día (p = 0.016), siendo mucho más altos los niveles de IL-6 en los fallecidos. Igualmente, se observaron diferencias significativas entre los niveles de ácido láctico y el recuento de plaquetas, no encontrándose diferencias en el caso de los niveles de anión GAP, PCR, PCT, fibrinógeno ni leucocitos. En cuanto a los niveles de Vit B12, no se halló asociación con la mortalidad.

Tabla 31. Asociación de la mortalidad a los 28 días con el estatus de ácido fólico, la vitamina B12, la vitamina D y otros parámetros en pacientes con *shock* séptico.

	Día 1		Día 3		Día 1 P	Día 1 P
	NO Media (DE)	SI Media (DE)	NO Media (DE)	SI Media (DE)		
Fol (ng/mL)	6.48 ± 5.33	13.78 ± 8.93	7.04 ± 6.63	9.10 ± 10.06	0.017	0.938
Vit B12 (pg/mL)	1001 ± 534	943 ± 500	1141 ± 421	1363 ± 238	0.652	0.454
Vit D (ng/mL)	9.89 ± 7.92	14.8 ± 14.2	6.42 ± 3.14	13.80 ± 1.68	0.164	0.010
IL-6 (pg/mL)	2880 ± 4787	43830 ± 71859	84 ± 142	2239 ± 2560	0.008	0.016
Pla (*10³/μL)	141.9 ± 88.5	96.2 ± 103.2	104.5 ± 55.6	29.3 ± 26.0	0.046	0.020
Lac (mmol/L)	3.94 ± 1.77	5.76 ± 1.82	1.45 ± 0.36	5.22 ± 2.98	0.014	0.004

p < 0.05 = significación estadística. Fol: Ácido fólico. Vit B12: Vitamina B12. Vit D: Vitamina D. IL-6: Interleucina-6. Pla: Plaquetas. Lac: Ácido láctico.

4.3.3. Asociación entre el estatus de ácido fólico, vitamina B12 y vitamina D con los niveles de ácido piroglutámico, ácido glutámico y la actividad de la glutatión peroxidasa.

A continuación, la **Tabla 32** muestra estudio de asociación entre los niveles de los tres parámetros de estudio (Fol, la Vit B12 y la Vit D) de los pacientes con *shock* séptico con los niveles en eritrocito, suero y orina de PiroGlu, Glu y GPx. Los niveles séricos de Vit B12 se correlacionaron con niveles séricos de Glu ($r = 0.384$; $p = 0.044$) de estos pacientes el primer día, es decir, cuanto más concentración de Vit B12 tenían en suero, más elevados se encontraban los niveles de Glu. También se encontró una correlación positiva de la concentración de Vit B12 con el rartioGlu/crea en orina ($r: 0.442$; $p = 0.024$). Los niveles de Vit D se correlacionaron con los niveles de Glu en suero ($r = 0.543$; $p = 0.45$) en el tercer día, siendo también positiva. Los niveles de Fol en suero se correlacionaron negativamente con los de Glu en orina ($r = - 0.659$; $p = 0.014$) en el tercer día. No se encontró ninguna asociación con los niveles de Piroglu, ni con la actividad de la GPx eritrocitaria.

Tabla 32. Estudio de la asociación del estatus de ácido fólico, la vitamina B12 y la vitamina D con los niveles de ácido glutámico tanto en suero como en orina.

		Día 1 Fol	Día 3 Fol	Día 1 Vit B12	Día 3 Vit B12	Día 1 Vit D	Día 3 Vit D
Día 1GluSuero	r	0.098	- 0.059	0.384	- 0.138	0.063	0.424
	p	0.621	0.840	0.044	0.637	0.750	0.131
Día 3GluSuero	r	0.209	- 0.077	0.025	0.354	0.516	0.543
	p	0.474	0.794	0.932	0.214	0.059	0.045
Día 1GluOrina	r	- 0.272	- 0.275	0.290	0.190	0.175	0.262
	p	0.179	0.342	0.151	0.515	0.393	0.366
Día 3GluOrina	r	- 0.484	- 0.659	- 0.526	- 0.394	0.582	0.335
	p	0.094	0.014	0.065	0.183	0.037	0.263
Día 1Glu/creaOrina	r	0.057	- 0.437	0.442	- 0.077	0.144	0.248
	p	0.782	0.118	0.024	0.792	0.484	0.392
Día 3Glu/creaOrina	r	0.066	0.291	0.383	0.305	- 0.308	- 0.209
	p	0.831	0.334	0.350	0.312	0.306	0.494

r = coeficiente de correlación. p< 0.05 = significación estadística. Fol: Ácido fólico. Vit B12: Vitamina B12. Vit D: Vitamina D. Glu: Ácido glutámico.

4.3.4. Comparación del estatus de ácido fólico, vitamina B12 y vitamina D con marcadores de fase aguda.

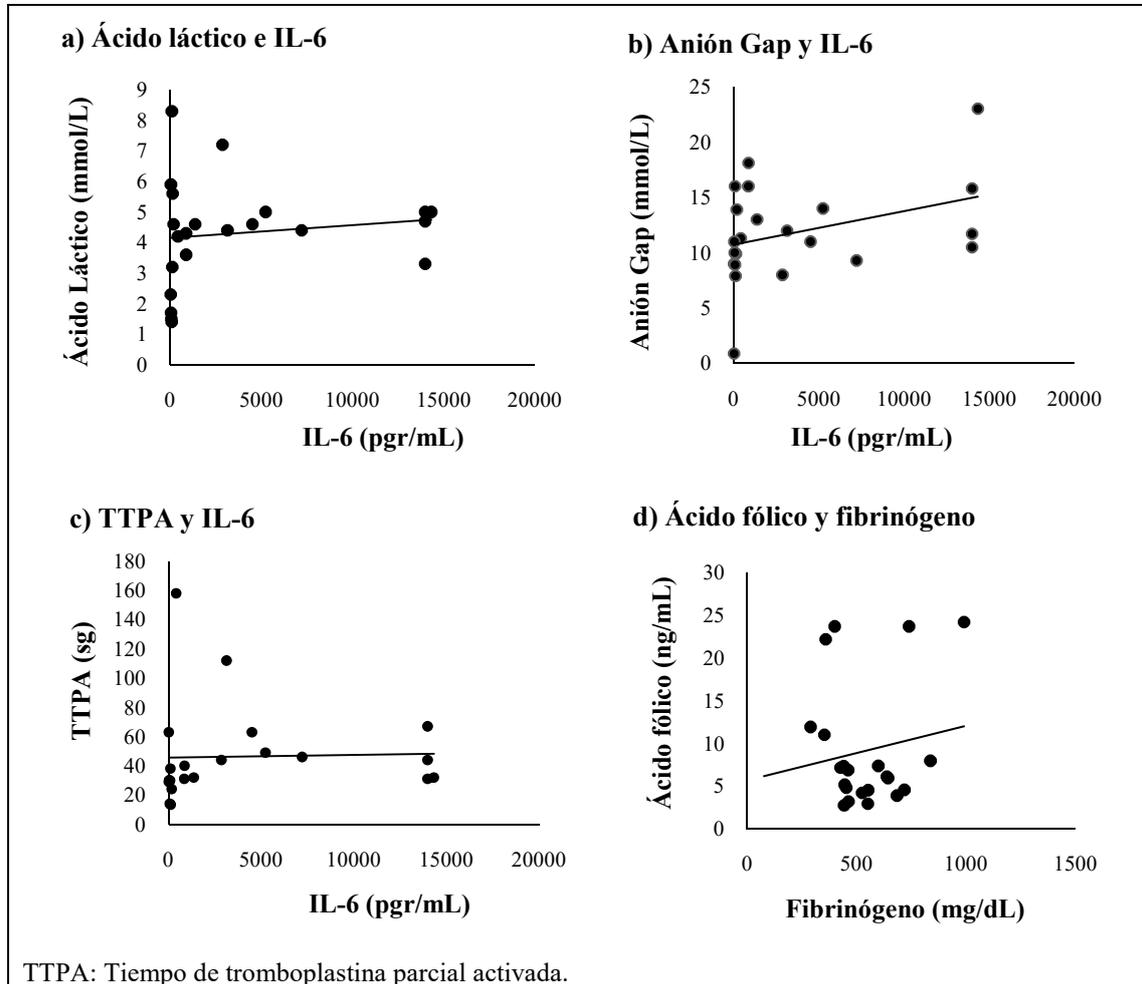
Posteriormente, se realizó un estudio de las asociaciones existentes entre los tres parámetros nutricionales de estudio (Fol, Vit B12 y Vit D) con las variables cuantitativas bioquímicas, respiratorias y hematológicas medidas en los pacientes con *shock* séptico.

En primer lugar se estudió la asociación existente entre los niveles de Fol, la Vit B12, la Vit D y la IL-6 con otros reactantes de fase aguda. En cuanto a los niveles de IL-6, éstos se correlacionaron con los niveles ácido láctico, tanto en el primer día (r = 0.524; p=0.007) como en el tercer día (r = 0.641; p= 0.018), con los niveles de GAP (r = 0.512; p= 0.009) en el primer día, y con el TTPA en el primer día (r = 0.552; p= 0.004) y al tercer día (r = 0.706; p= 0.007).

Al hacer el mismo estudio con el Fol, obtuvimos correlaciones entre los niveles de Folylos niveles de fibrinógeno (r = 0.382; p= 0.045) en el primer día. También hubo una correlación entre los niveles de ácido fólico en el primer día y los niveles de ácido fólico en el tercer día (r = 0.939; p<0.001), siendo esta asociación positiva. En cuanto a la Vit D, se encontraron correlaciones en el primer día de estancia en la UCI con el pH (r = - 0.375; p< 0.05), con los niveles de fibrinógeno (r = 0.468; p= 0.012), y con los niveles de bilirrubina (r = 0.681; p< 0.001). En el caso del pH, éste disminuyó al aumentar los niveles de Vit D, y en el caso del fibrinógeno y la bilirrubina, aumentaron

al aumentar los niveles de Vit D. Algunas de estas correlaciones se muestran en la **Figura 14**.

Figura 14. Correlación entre el estatus de ácido fólico y la interleucina-6 con marcadores de fase aguda.



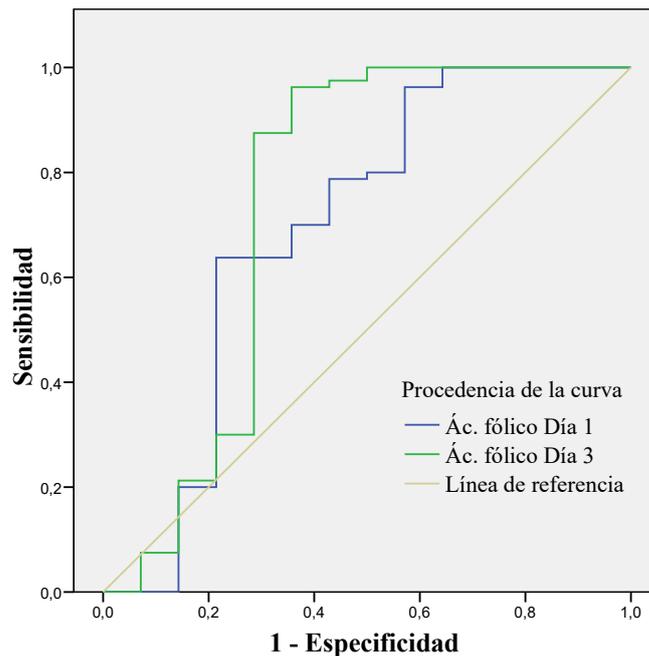
Por otro lado, se estudiaron los niveles de Vit B12, Fol y Vit D con la capacidad antioxidante total, no observándose correlaciones estadísticamente significativas entre ninguno de los parámetros analizados.

4.3.5. Curvas ROC según el estatus de ácido fólico, vitamina B12 y vitamina D.

En este apartado se pretende hacer una búsqueda de la utilidad de las variables Fol, Vit B12 y Vit D en la aparición de la enfermedad de la sepsis. Para ello se calcularon las curvas ROC de dichos parámetros y se halló el Área Bajo la Curva (ABC), la sensibilidad y la especificidad para predecir la aparición de *shock* séptico de cada una de las variables.

Se calculó la curva ROC del ácido fólico para tratar de predecir su capacidad de discernir entre la enfermedad de *shock* séptico y pacientes sanos. Como se puede observar en la **Figura 15**, la curva se acerca mucho a la línea de no discriminación. La curva que muestra la figura es la curva inversa, es decir, las concentraciones bajas de ácido fólico caracterizan la aparición de la enfermedad.

Figura 15: Curva ROC del ácido fólico.

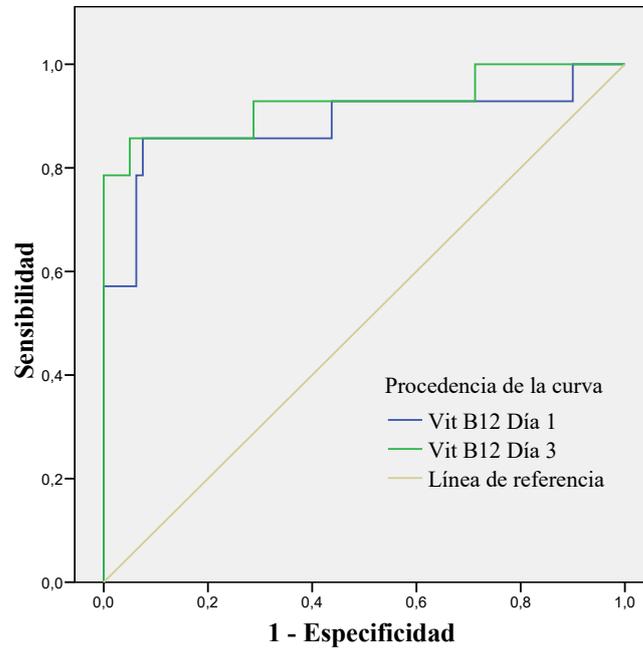


En la **Tabla 33** se muestra el ABC, la especificidad y sensibilidad del ácido fólico considerando como punto de corte unos niveles de 7 ng/mL. Para este punto de corte se observó un ABC mediana y, una especificidad y sensibilidad medianas también.

Tabla 33. Sensibilidad, especificidad y ABC del ácido fólico.

	Sensibilidad	Especificidad	ABC
Ácido Fólico Día 1	0.700	0.643	0.695
Ácido Fólico Día 3	0.688	0.714	0.743

Seguidamente, se calculó la curva ROC, para determinar la capacidad de predecir el diagnóstico de *shock* séptico de la Vit B12. Esta curva se puede observar en la **Figura 16**. Se observó cómo la curva se aleja de la línea de referencia.

Figura 16: Curva ROC de la vitamina B12.

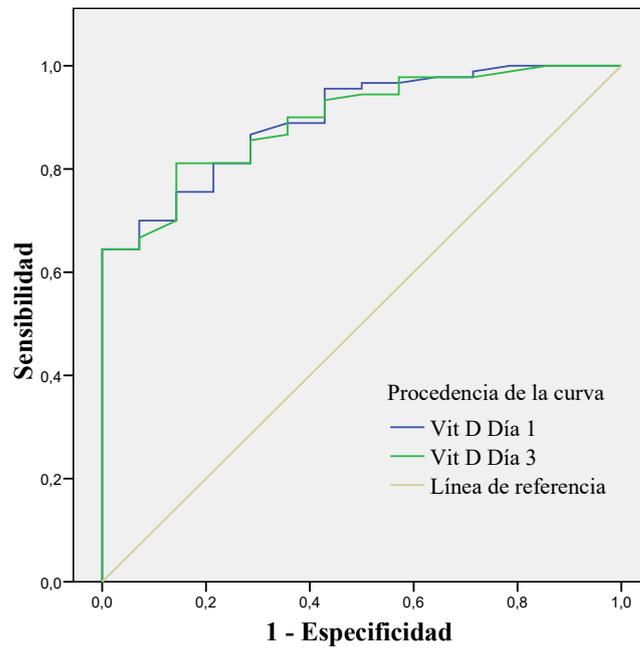
En cuanto al ABC, la sensibilidad y especificidad se muestran en la **Tabla 34**, considerando como punto de corte unos niveles de 513 pg/mL, que se corresponde con el límite superior de los valores de referencia. Como se pudo observar, la Vit B12 mostró una alta ABC, alta sensibilidad y mediana especificidad.

Tabla 34. Sensibilidad, especificidad y ABC de la Vitamina D.

	Sensibilidad	Especificidad	ABC
Vitamina B12 Día 1	0.857	0.675	0.886
Vitamina B12 Día 3	0.929	0.675	0.925

Por último, se calculó la curva ROC de la Vit D para determinar la capacidad de predecir la enfermedad de *shock* séptico. La curva ROC de la Vit D se muestra en la **Figura 17**, también se trata de la curva inversa como en el caso del Fol. Se pudo observar en este caso la amplia separación de la curva de la línea de referencia.

Figura 17. Curva ROC de la Vitamina D.



También se averiguó el ABC, la sensibilidad y la especificidad de la Vit D, como se puede observar en la **Tabla 35**. Se consideró como punto de corte 10 ng/mL, aunque se consideró que por debajo de 20 ng/mL hay deficiencia, pero el valor de 10 ng/mL reflejó un mejor equilibrio entre la sensibilidad y la especificidad. En el caso de la Vit D, su ABC y la sensibilidad resultaron ser altas, aunque la especificidad fue mediana para este punto de corte.

Tabla 35. Sensibilidad, especificidad y ABC de la Vitamina D.

	Sensibilidad	Especificidad	ABC
Día 1 Vitamina D	0.867	0.714	0.896
Día 3 Vitamina D	0.867	0.643	0.895

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

A continuación se hace una evaluación de la metodología seguida en el estudio, de las características de los pacientes con shock séptico y controles, y de los resultados obtenidos. Generalmente, los resultados obtenidos son muy parecidos a los esperados y se han podido establecer relaciones entre parámetros que dan más luz al alterado y complejo metabolismo ocurrido en estos pacientes tan graves.

5.1. Evaluación de la metodología utilizada en el estudio.

La muestra de pacientes con sepsis que obtuvimos fue seleccionada meticulosamente para obtener los casos más graves. La muestra fue obtenida de manera consecutiva a medida que los pacientes ingresaron en la UCI, además de reunir los criterios de inclusión establecidos. Los pacientes que compusieron la muestra fueron finalmente 28. Una vez realizado el cálculo del tamaño muestral y dado que la bibliografía existente a día de hoy no muestra datos de prevalencia e incidencia que nos permitan realizar el cálculo, el presente estudio puede considerarse como un pilotaje. Una muestra de 28 sujetos, dada la dificultad en reclutar pacientes con unos criterios tan específicos, ha resultado ser suficiente para obtener una visión clara aunque no determinante de los objetivos perseguidos en este proyecto. No obstante, el presente estudio continúa abierto y los pacientes siguen siendo incluidos hasta obtener datos concluyentes que nos permitan extrapolar a la población general con *shock* séptico con estas características.

5.2. Evaluación de las características clínicas y bioquímicas de los casos.

Los pacientes seleccionados cumplen todos los criterios para clasificarlos como *shock* séptico. Se ha observado que en nuestro grupo de casos, el *shock* séptico es más común en varones. Esta prevalencia mayor en hombres ya se observó en otros estudios (54,55), siendo en estos más común la tasa de hospitalización y mortalidad, y en mujeres la letalidad. En nuestros pacientes se observa una gravedad importante ya que las escalas de SOFA y un APACHE II mostraron valores muy elevados. Igualmente, en

nuestros pacientes la complianza se aleja de los valores de referencia, lo que da una idea del grado de gravedad en el que se encuentran.

Según los resultados obtenidos en nuestro estudio y referidos a la evolución de la estancia en UCI, encontramos que los pacientes seleccionados presentaron una mejora general clínica que se puede objetivar en el descenso de los valores de la escala SOFA así como en el FiO_2 , y en el aumento de la PAM. Esta mejora es posiblemente debida al soporte recibido por los protocolos establecidos en la UCI. Por otro lado, el ácido láctico desciende al tercer día, lo que parece obedecer a una restauración del metabolismo aeróbico, es decir, a un descenso del estado de isquemia. La correlación descrita en nuestro estudio entre el anión GAP y la escala de gravedad APACHE II, nos hace pensar que la acidosis metabólica generada está influyendo en el empeoramiento clínico del paciente.

En cuanto a los parámetros bioquímicos, las medias de creatinina y bilirrubina estuvieron bastante por encima de los valores de referencia. Estos valores dan una idea de la situación hipercatabólica y el posible fallo orgánico que presentan estos pacientes. En la última definición de sepsis en 2016 incluye la medición de la concentración de bilirrubina para determinar la progresión de la insuficiencia orgánica, que indica un peor pronóstico (9). En nuestro caso, este parámetro no mostró cambios significativos a lo largo de los tres días de estancia en UCI. Sin embargo, el aumento de la concentración de GPT observado al tercer día de estancia en UCI, nos puede orientar sobre el daño hepático que presentan nuestro pacientes que no está restaurado.

Los parámetros hematológicos como la hemoglobina y el recuento de plaquetas, también manifiestan un descenso en los tres días de estancia en la UCI. Esto también parece ser consecuencia del daño celular sufrido días antes. La trombocitopenia es debida al consumo sufrido durante la estancias siendo considerada un marcador negativo en situación de infección, y contribuyendo a la exterminación del patógeno microbiano (314). El descenso de la PCT al tercer día parece ser consecuencia de la respuesta al tratamiento antibiótico. Se sabe que la PCT es un biomarcador específico de infecciones bacterianas (315) además de ser útil en el pronóstico de pacientes sépticos (316).

En general, se observa una mejora clínica en los pacientes al tercer día, aunque en los parámetros bioquímicos todavía se observa el daño orgánico generado. Los biomarcadores pueden reflejar una situación patológica orgánica que los signos clínicos

no pueden objetivar. El manejo de estos biomarcadores es primordial para poder tratar y hacer seguimiento a estos pacientes.

5.3. Evaluación de los resultados del estatus de ácido piroglutámico, de ácido glutámico y la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa.

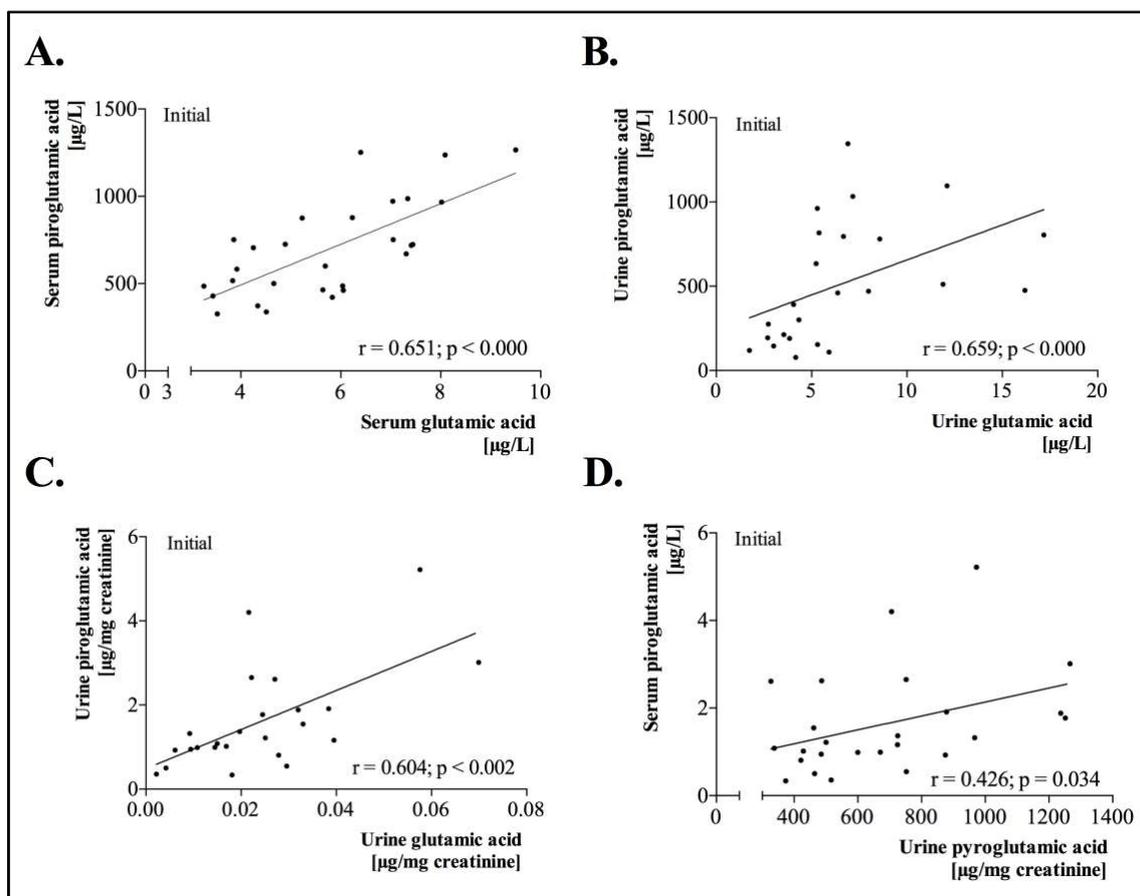
El principal objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles elevados de PiroGlu en suero y orina, y se ha observado una prevalencia alta de niveles alterados tanto en suero como en orina/crea (85-65%, respectivamente). Queda demostrado en nuestro estudio que existen altos niveles de PiroGlu en pacientes con *shock* séptico en comparación con muestras de pacientes sanos. Es la primera vez que se determinan los niveles de PiroGlu en pacientes con *shock* séptico y se compara con un metabolito de su ciclo, Glu. También encontramos en este estudio, que tanto los niveles de Glu en suero (el primer día), como los niveles en orina (no observándose en la expresada entre mg de creatinina) y la actividad GPx de los eritrocitos, se encontraron más bajos en estos pacientes en comparación con las muestras de los controles.

Como en nuestro estudio, también se observó una disminución de los niveles de Glu en pacientes con *shock* séptico en otros estudios (317). El descenso de los niveles de Glu en estos pacientes pudo ser debido a su complejación con el amonio para convertirse en glutamina. La glutamina es la forma no tóxica de acumulación del ión amonio. En estos pacientes el ión amonio es elevado debido a la gran destrucción proteica que se lleva a cabo. Los aminoácidos procedentes de esta destrucción proteica acaban convirtiéndose por la transaminación y la dexamínación oxidativa en el ión amonio. Al ciclo de la urea no le da tiempo de eliminar esa acumulación de amonio. Es por eso, que se guarda la molécula de amonio en forma de glutamina: $\text{NH}_4^+ + \text{Glu} \rightarrow \text{Glutamina}$. El ciclo de la urea requiere de ATP y el individuo con *shock* séptico no dispone de ésta molécula. Por otro lado, se ha visto *in vitro* que el PiroGlu es capaz de inhibir eficientemente la fosfodiesterasa humana recombinante-5A1, la enzima convertidora de angiotensina (ECA) humana y la ureasa (318). La ureasa es una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de la urea en dióxido de carbono y amonio. Ésta es otra forma de impedir que se acumule el amonio en el organismo, ya que el amonio es neurotóxico. La razón principal por la que encontramos los niveles de Glu disminuidos es explicada más adelante.

En cuanto a la evolución del paciente, se pudo observar que en el tercer día existió una disminución significativa en la puntuación de la escala SOFA. Este descenso de la escala SOFA en los pacientes con *shock* séptico se produce como consecuencia de las medidas de apoyo llevadas a cabo en la UCI. Sin embargo, los niveles de PiroGlu/crea en orina aumenta significativamente al tercer día, sin verse afectado por estas medidas. Por lo tanto, los niveles de Piro Glu deben ser considerados como un predictor de la gravedad mediada por el estrés oxidativo, que actúa independientemente de las escalas de gravedad, y que no se ve influenciado por las medidas de soporte, ya que es un reflejo de la depleción de las reservas de GSH. Proponemos que se debe evaluar el PiroGlu en pacientes críticos con *shock* séptico, ya que se puede detectar la depleción de GSH y se puede actuar en consecuencia.

En la **Figura 18** se observan las gráficas de correlaciones más importantes encontradas entre los niveles de PiroGlu, Glu y la actividad de la GPx. Se puede observar que los niveles de PiroGlu correlacionan bien con los niveles de Glu tanto en suero (**Figura 18A**) como en orina (**Figura 18B y 18C**). La determinación del estrés oxidativo es limitada en la práctica clínica diaria. La razón fundamental es la dificultad para medir los diferentes aspectos del estrés oxidativo, que implican varias pruebas: glutatión oxidado, glutatión reducido, glutatión peroxidasa, Gr, etc.

Este estudio propone el uso del parámetro de PiroGlu como predictor de estrés oxidativo debido al agotamiento de GSH. Aunque esta prueba no está disponible de manera rutinaria en el laboratorio clínico, o al menos para estas afecciones, este estudio presenta datos que apoyan su utilidad, aunque son necesarios más trabajos antes de incluirlo en la práctica clínica. Al presentarse una correlación positiva y significativa entre los niveles de PiroGlu en orina y los niveles de PiroGlu en suero (**Figura 18D**), podríamos proponer que se puede medir en orina ya que la orina es una muestra más fácil de obtener.

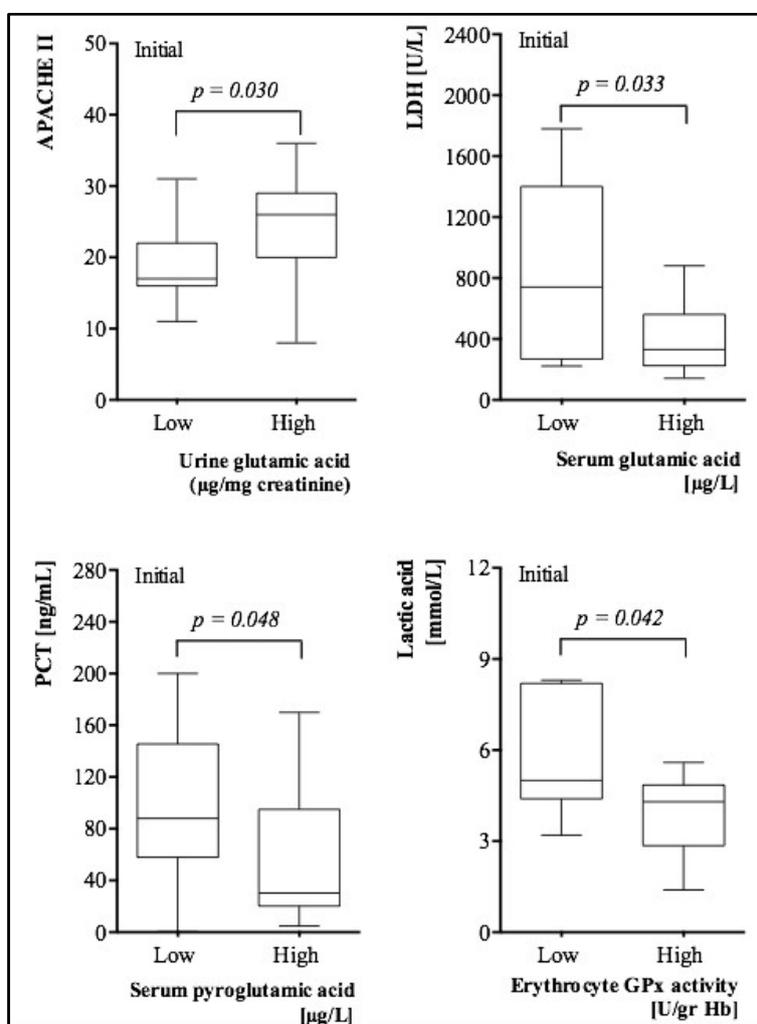
Figura 18.- Asociación entre ácido piroglutámico y ácido glutámico en suero y orina.

Los niveles de ácido piroglutámico (PiroGlu) tienen una correlación significativa con los niveles de ácido glutámico (Glu) tanto en el punto inicial como en el final ($r = 0.651$, $p < 0.001$) (**Figura 18A**) y ($r = 0.767$, $p < 0.001$), respectivamente. En el caso de PiroGlu, se observa una correlación entre suero y orina/creatinina ($r = 0.426$; $p = 0.034$) como muestra la **Figure 18B**. Además, observamos una correlación entre PiroGlu en orina y Glu en orina al inicio ($r = 0.659$, $p < 0.001$) (**Figure 18C**) y al final ($r = 0.665$, $p = 0.013$), y entre PiroGlu en orina/creatinina y Glu en orina/creatinina ($r = 0.604$; $p = 0.002$) (**Figure 18D**).

En nuestro trabajo, se observan correlaciones entre los niveles de PiroGlu, Glu y la actividad de GPx con algunos marcadores bioquímicos, respiratorios y marcadores de severidad. Estos resultados ponen de manifiesto la asociación entre los parámetros de la vía del GSH y las alteraciones metabólicas de estos pacientes. En la **Figura 19** se observan las correlaciones más importantes entre los niveles de PiroGlu, Glu y la actividad de la GPx, y parámetros de gravedad. Es de destacar la relación inversa encontrada entre los niveles de Glu y los niveles de GOT, lo que parece responder a un daño hepático donde a medida que aumenta el daño hepático y la concentración de GOT, disminuyen los niveles de Glu. Un estudio (317), mostró que las concentraciones plasmáticas de Glu en pacientes con *shock séptico* se encontraban disminuidas en los

pacientes que no sobrevivieron en comparación con los que sobrevivieron, siendo más bajo el cociente Glu/glutamina en los que no sobrevivieron. Igualmente, encontramos una correlación de la escala APACHE II con los niveles de Glu en orina, aunque en este caso la relación positiva. La relación observada entre los niveles séricos de Glu y LDH, PiroGlu y PCT, y GPx con ácido láctico encontrados en nuestros pacientes con *shock* séptico parece responder a que los niveles alterados de PiroGlu, Glu y GPx pueden indicar gravedad en los pacientes con *shock* séptico.

Figura 19. Comparación de parámetros de severidad con ácido piroglutámico, ácido glutámico y glutatión peroxidasa.



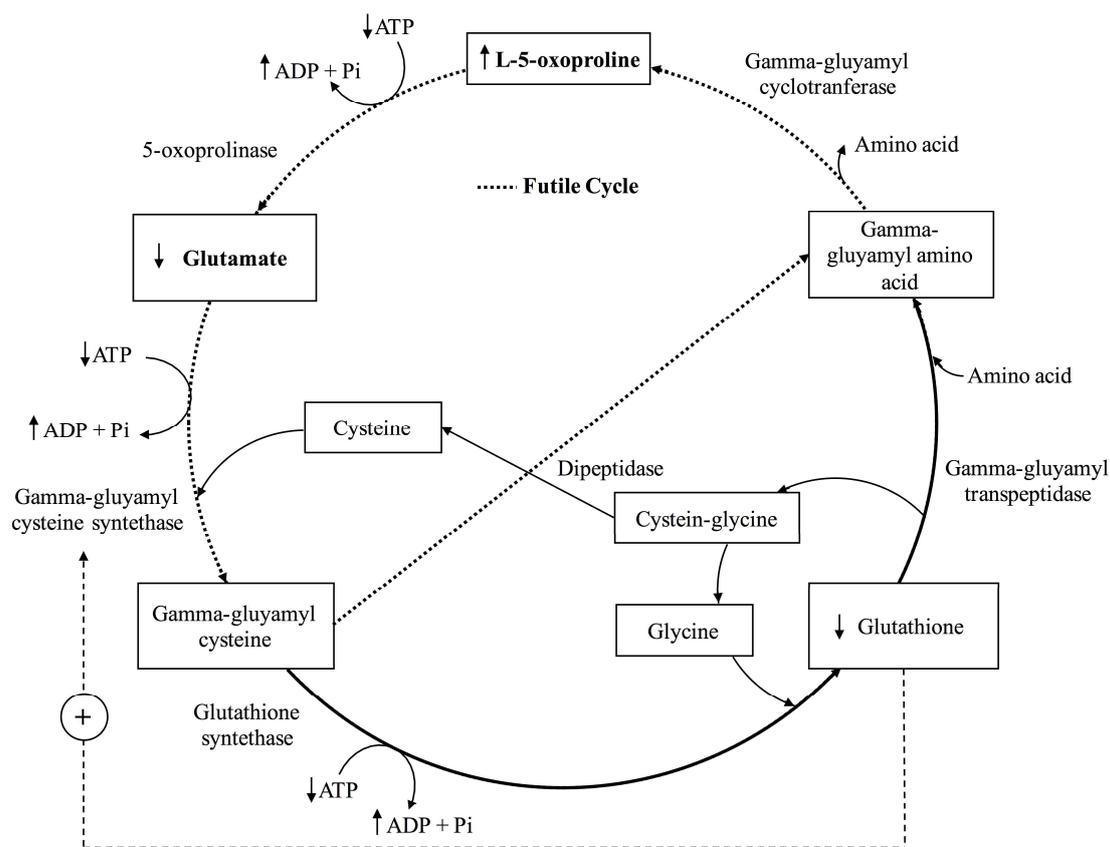
El punto de corte está establecido por la mediana para cada una de las variables analizadas (niveles bajos vs niveles altos).

5.3.1. Evaluación del ciclo gamma-glutamil: ácido piroglutámico y ácido glutámico.

Estos desórdenes observados en nuestro estudio, los atribuimos a la depleción de GSH siguiendo el mecanismo del ciclo gamma-glutamil (**Figura 20**). En este ciclo se puede observar que los niveles elevados de PiroGlu en estos pacientes podrían deberse a tres causas principales: (I) el catabolismo de la GSH a través de la gamma-glutamiltanspeptidasa; (II) y/o al factor limitante en el segundo paso de la gamma-glutamiltansintetasa; (III) o al factor limitante en el siguiente paso que involucra a la glutatión sintetasa (282). La gamma-glutamiltansintetasa (II) es la principal enzima limitante de este ciclo, se trata de una reacción no alostérica y se encuentra inhibida por las concentraciones fisiológicas de GSH. El impacto de la depleción de ATP preexistente en los sucesivos pasos causa que el GSH no se sintetice a través de la glutatión sintetasa (III), lo cual puede ser causado también por la deficiencia de glicina. Adicionalmente, los niveles bajos de GSH aumentan la actividad de la gamma-glutamiltansintetasa (ya que los altos la inhiben), lo que provoca que el ciclo continúe pero por otra vía.

Bajo condiciones limitantes de cisteína, la Glu se recicla en Glu (un ciclo fútil), es decir, a través de la 5-oxoprolinasa se forma PiroGlu para volver a formar Glu. Esta reacción se produce a expensas de dos moléculas de ATP sin producción de GSH (por eso es un ciclo fútil, porque se produce gasto de ATP sin la síntesis de ninguna molécula) y es la razón de la disminución en la síntesis de GSH, así como el agotamiento del ATP en estas células (319). Existe evidencia previa de la disminución mitocondrial del ATP en pacientes sépticos, como se puede observar en el estudio de Brealey et al. (263,320). Este estudio mostró que existe una asociación entre la mortalidad en pacientes sépticos y la disfunción mitocondrial, entendiéndose este último como un descenso significativo en el nivel de ATP. Este ciclo fútil está activado por la depleción de GSH y de cisteína. La probable insuficiencia de cisteína será desarrollada más tarde.

Figura 20. Ciclo gamma-glutamil alterado.



La disminución de los niveles de glutatión (GSH) celular conduce a una disminución de la inhibición por retroalimentación de la gamma-glutamylcisteína sintetasa. Esto da como resultado una formación excesiva del dipéptido gamma-glutamylcisteína, que se convierte mediante gamma-glutamyl-ciclotransferasa en ácido piroglutámico (PiroGlu). La sobreproducción de PiroGlu excede la capacidad de la 5-oxoprolinasa, y el PiroGlu se acumula en los fluidos corporales y se excreta en la orina (320). Este mecanismo también explica los niveles de ácido glutámico ya que la reacción catalizada por la 5-oxoprolinasa es más lenta porque depende del ATP.

El metabolismo del GSH se altera significativamente en pacientes con desnutrición durante su estancia en la UCI y se encontró directamente asociado con la mortalidad a los 28 días (321). Como ya se observó en el apartado de introducción, el estrés oxidativo que se produce durante una situación de sepsis aumenta el potencial redox, es decir, los niveles de GSH estarán bajos y los de GSSH estarán altos. Esto fue medido en el estudio de Németh (300), donde se determinó que la relación GSSH/GSH estaba muy elevada en los pacientes con *shock* séptico y fue atribuido al proceso de respuesta inflamatoria excesiva que padecían los pacientes. Por otro lado, en el estudio de Lyons (299), donde se mide el GSH en niños con situación de sepsis, se observa que las concentraciones de GSH en sangre y las tasas de síntesis se encuentran disminuidas.

Este autor lo atribuye a mecanismos multifactoriales relacionados con la respuesta inflamatoria en presencia de un soporte nutricional limitado.

En el estudio de Karapetsa et al. (254) en 201, se observó que los niveles plasmáticos de GSH van decreciendo en los pacientes con *shock* séptico que fallecen en el transcurso de 8 días, mientras que los niveles de GSH se mantienen en el tiempo en el caso de los pacientes que sobrevivieron.

Diversos estudios avalan que los niveles altos de PiroGlu están relacionados con depleción de GSH. En un estudio realizado por Jackson (301), se administró un aporte adecuado de proteínas a 12 personas cuyos niveles de PiroGlu se mostraban elevados y los de GSH disminuidos, e iban aumentando progresivamente con la dieta proteica. La manifestación del estrés oxidativo se pudo observar por el descenso de la GSH como una molécula antioxidante, o por el aumento de una molécula que refleja el estado del GSH, el PiroGlu, concluyendo que el descenso inicial del GSH como adaptación a la cantidad segura de proteína sugiere una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo. Otro estudio realizado por Lord (302), relacionó los niveles elevados de PiroGlu en sangre con la alteración en la síntesis del GSH dentro del ciclo gamma-glutamil. Por otro lado, Suzanne (303) aplicó acetaminofeno a un grupo de personas provocando un agotamiento hepático del GSH y unas concentraciones de PiroGlu elevadas tanto en suero como en orina. Esta autora concluyó que estos resultados pudieron verse influenciados por las concentraciones de metionina celular. También se han visto niveles superiores en plasma y orina de PiroGlu e inferiores de GSH en sangre total en individuos quemados, y por tanto con un elevado estrés oxidativo, en comparación con individuos sanos (304).

En cuanto al estudio de Lord(305) previamente mencionado, se consideró al PiroGlu como un marcador urinario relacionado con el GSH, observando que en mujeres sometidas a un estrés metabólico, los niveles de PiroGlu se alteran. El cambio que se observa en los niveles de PiroGlu en estas pacientes pudo ser atribuido a la desaparición o aparición de la menstruación.

Otro estudio (306) observó que la restricción de aminoácidos de glicina o azufre alteran la cinética de PiroGlu y su excreción urinaria. Por otro lado, también se ha visto que la tasa estimada de síntesis de glicina de *novo* es menor en pacientes con

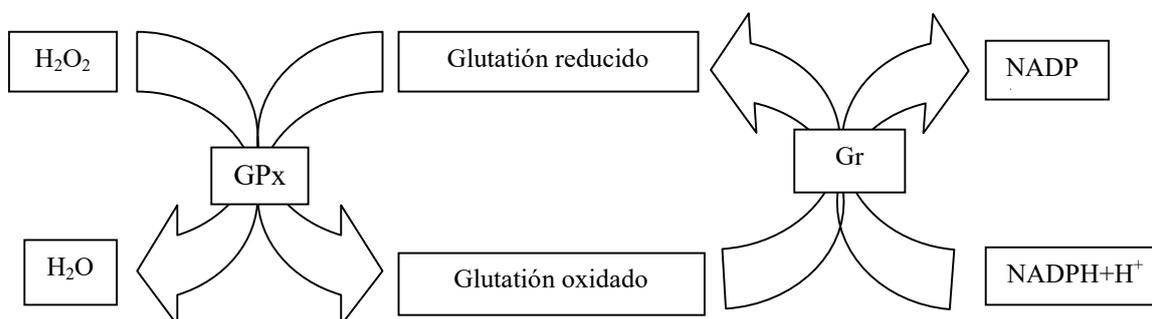
quemaduras, sugiriendo un posible cambio en la disponibilidad de glicina para la síntesis de GSH (304).

En resumen, el exceso de PiroGlu en un paciente séptico, sin deficiencia enzimática en el ciclo gamma-glutamil, podría estar asociado con el agotamiento del GSH y, por lo tanto, con un estrés oxidativo excesivo y sus consecuencias negativas. El incremento de PiroGlu y el descenso de Glu en pacientes sépticos parece reflejar el bajo contenido celular de ATP que provoca un bloqueo en el ciclo gamma-glutamil desde el primer paso que requiere ATP después de la síntesis de PiroGlu.

5.3.2. Evaluación de los resultados de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa.

El potencial redox global de una célula está determinado principalmente por pares químicos oxidables/reducibles, incluyendo glutatión/disulfuro de glutatión, tiorredoxina reducida/tiorredoxina oxidada, NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, como se muestra en la **Figura 21**.

El gasto de las especies reducidas conocidas (NADH^+ , glutatión reducido, etc.) para "neutralizar" los compuestos nocivos, debilita la capacidad del organismo para combatir el estrés oxidativo adicional. La GPx-1 es uno de los miembros más abundantes de la familia de enzimas GPx. Se encuentra presente en todas las células, localizadas principalmente en compartimentos peroxisomalescitósolicos, mitocondriales (296), y se ha encontrado que es más eficaz que la catalasa en la eliminación de peróxidos intracelulares bajo muchas condiciones fisiológicas (297). Se ha observado que estos pacientes tienen una actividad GPx que no contribuye a la eliminación de los radicales libres porque está disminuida con respecto a los pacientes control. Aunque numerosos estudios han medido la actividad de la GPx en pacientes con sepsis, los resultados siguen sin ser concluyentes (322,323).

Figura 21. Ciclo de óxido-reducción de la glutatión peroxidasa.

La glutatión peroxidasa-1 (GPx-1) es una enzima antioxidante intracelular que reduce enzimáticamente el peróxido de hidrógeno a agua para limitar sus efectos nocivos. GPx, glutatión peroxidasa; Gr, glutatión reductasa.

En pacientes con *shock* séptico, el estrés oxidativo se ha asociado con la mortalidad. Sin embargo, la actividad de la GPx medida en estos pacientes no se ha relacionado con la mortalidad(161).

5.3.3. Evaluación de los resultados sobre los niveles selenio.

En cuanto a los niveles de Se, en nuestro estudio, encontramos una disminución significativa en plasma en relación con la estancia en UCI. Este descenso ha sido repetidamente observado en pacientes sépticos desde 1998 (324), y está relacionado con la unión de la selenoproteína P al endotelio, para que se produzca una extravasación de proteínas en la etapa temprana de la sepsis, y una disminución de la regulación de la síntesis hepática de selenoproteína P (323). También se observó un descenso de selenio en suero gradual durante 7 días en pacientes con sepsis en otro estudio (325). Encontramos también un descenso de Se significativo en eritrocito en relación con la estancia en UCI. El contenido de Se eritrocitario, no interfiere con la sepsis. Sin embargo, el contenido de Se eritrocitario es un marcador preciso del estado de Se antes del *shock* séptico (326–328) y es un buen marcador del estado de Se a largo plazo(329).

En ciertas zonas de laprovincia de Granada existe una posible baja ingesta de Se (329), por tanto, se espera que una deficiencia previa de Se reduzca la resistencia al estrés oxidativo. La variación de la concentración de Se entre el primer y tercer día en

UCI puede estar relacionada con transfusiones, hemólisis o la edad de algunos pacientes. Hace tiempo que es sabido que la enfermedad letal de Keshan está relacionada con una deficiencia severa de Se. Esta deficiencia de Se induce la mortalidad por miocarditis causado por una infección por *Coxsakiavirus*(330). Esta enfermedad ha sido prevenida por el aporte de complementos nutricionales enriquecidos con Se en la región de Kesham, China.

En nuestro trabajo, no pudimos asociar el Se con otros parámetros del estudio, probablemente debido nuestra limitación de tamaño muestral. Actualmente, se admite que un aumento moderado de la administración de Se en comparación con los requerimientos diarios (con un máximo de aproximadamente 300µg/día), es en gran medida suficiente en pacientes sépticos, incluso en aquellos que sufren diálisis o quemaduras prolongadas. Esta dosis es más baja que el límite superior de EEUU. El contenido de Se en el organismo es de 10 a 20 mg aproximadamente, y el compartimento plasmático contiene solo una pequeña fracción del contenido de Se en el organismo (menos de un 2%). El Se se requiere para la actividad de la GPx ya que está incluido en el centro activo de la GPx bajo la forma del aminoácido selenocisteína, la cual es requerida para su actividad. Por lo tanto, la suplementación es de vital importancia en pacientes que no tienen suficientes niveles de Se. En un estudio observacional prospectivo (331) se mostró que la concentración de Se predice la mortalidad en pacientes con *shock* séptico. La suplementación con altas dosis de Se no ha mejorado los resultados clínicos de pacientes con *shock* séptico (332), aunque estos estudios son controvertidos (333).

El Se es un oligoelemento esencial y es importante su interacción con los otros oligoelementos (el yodo y el hierro), ya que, en conjunto, contribuyen al estado adecuado de la hormona tiroidea. Por ello, es importante la suplementación con estos elementos ya que la síntesis, la secreción, el metabolismo y la acción de la hormona tiroidea en los tejidos diana dependen de subdisponibilidad nutricional en el organismo. En las enfermedades benignas y malignas del tiroides se ve alterado el Se, por lo que se han utilizado preparados para prevenir o tratar enfermedades como el bocio, enfermedad tiroidea autoinmune o cáncer de tiroides. Uno de los pacientes de nuestro estudio presentaba hipotiroidismo como enfermedad subyacente. Se ha visto en algunos estudios que al administrar Se en la tiroiditis autoinmune (tiroiditis de

Hashimoto) y la enfermedad de Graves leve, se mejora la clínica y el bienestar de los pacientes, además los anticuerpos antitiroperoxidasa se ven disminuidos. A día de hoy aún existe controversia respecto la forma utilizada de administración según se encuentre el estado basal del Se, la dosis y el tiempo. Para mantener un tiroides saludable y funcional, se requiere un suministro nutricional de Se, yodo y hierro, siendo la administración adecuada de Se, la que de saturación de la expresión de la selenoproteína P circulante (334).

5.3.4. Evaluación de la acidemia piroglutámica.

En cuanto al equilibrio ácido-base, se observa que hay una tendencia a normalizar la acidez sanguínea en el tercer día de estancia de nuestros pacientes en la UCI. Observamos una mejora en los parámetros que influyen en la acidemia después de tres días dado el descenso del ácido láctico, el exceso de bases y en el aumento del pH (aunque no de forma significativa). No obstante la acidemia piroglutámica aumenta en el tercer día como consecuencia de la acumulación de PiroGlu en la ruta gamma-glutamil que ha quedado explicada anteriormente. Este aumento también se observa en el Glu, que queda bloqueado probablemente por no disponer de cisteína suficiente para sintetizar el GSH. Esto sugiere que la acidemia piroglutámica no contribuye en gran medida al aumento de la acidemia, puesto que la media del pH se mantiene al tercer día. Sin embargo, la alteración del PiroGlu se muestra como un marcador probable del agotamiento del GSH que no contribuye a la eliminación de los radicales libres.

En los últimos años, se han publicado diversos casos clínicos de pacientes con acidosis piroglutámica (298,335–338), aunque se ha observado de forma aislada y no se ha mencionado su comportamiento en el metabolismo general que tiene lugar en un paciente con *shock* séptico. Los casos clínicos encontrados en la literatura respecto a pacientes con acidosis piroglutámica son secundarios a una intoxicación medicamentosa por acetaminofeno (339–345), por antiproliferativos y antibióticos (346). Recientemente, se describió el caso de una mujer de 69 años con sepsis urinaria con acidosis metabólica con anión GAP elevado donde se encontraron altos niveles de ácido láctico y PiroGlu (347). En otro estudio, se valoró una muestra de pacientes con una alta

acidemia metabólica y se observó que el grupo de pacientes que tenían mayores niveles de PiroGlu, a su vez coincidía con los que tenían *shock* séptico (50%) (348).

En nuestro estudio se observa una prevalencia de acidemiapiroglutámica elevada en pacientes con *shock* séptico, en presencia de acidemia metabólica con anión GAP elevado. En el anión GAP elevado también puede influir la hiperlactaemia, el fallo renal o lacetoacidosis a parte del PiroGlu (340). El déficit de GSH podría ser el responsable de esta acidemiapiroglutámica y habría que considerar su reposición mediante la administración de NAC, sobretodo en el caso de aquellos pacientes con *shock* séptico con acidemia y con anión GAP elevado sin otra causa (348).

5.3.5. Evaluación de los resultados de la capacidad antioxidante total.

En nuestro estudio, Los niveles de CAT en los casos no ha mostrado tener un aumento o disminución significativa con respecto a los controles. Ya en 1998, Pascual (349) observó que su muestra de pacientes con *shock* séptico tuvieron niveles plasmáticos de CAT más elevados que los controles, cuya justificación fue una respuesta del organismo al aumento de prooxidante producido en esta enfermedad. En el mismo estudio, en el grupo de pacientes con sepsis no grave observó niveles de CAT más bajos que los controles. En otro estudio de pacientes con sepsis grave se realizó un seguimiento durante 15 días, y observaron que los niveles de CAT se encontraron disminuido a en el primer día respecto a los controles sanos (242). Es posible que nosotros no observáramos esta diferencia entre casos y controles debido a la limitación del tamaño de la muestra.

En nuestro estudio sí se observó una relación directamente proporcional con la gravedad. Se ha visto una asociación de la CAT con el APACHE II, con la edad y con los días de ventilación mecánica, pudiendo ser atribuidos a la respuesta que experimenta el organismo frente al ataque de los radicales libres generados que intenta defenderse sacando todo el arsenal de antioxidantes del que dispone. Por otro lado, en el transcurso de la enfermedad se están consumiendo muchos antioxidantes y es la razón que puede explicar que acaben equilibrándose los niveles. Un reciente estudio (350) de pacientes con sepsis, observó una asociación de la CAT con el malondialdehído y el SOFA, donde los pacientes más graves eran los que mayores niveles de CAT tenían. Al igual

que en nuestro estudio, se encontró una asociación de la escala APACHE II con los niveles séricos de CAT (351). También se vio una asociación de la CAT con SOFA y con las escalas de disfunción orgánica en otro estudio de pacientes con sepsis (325). Analizando otro estudio (352) donde se midió los niveles de CAT en suero en pacientes críticos, se encontraron resultados elevados aquellos pacientes con mayor disfunción orgánica. En el mismo estudio encuentran una asociación directa del ácido úrico con los niveles de la CAT hallada en suero. Es sabido que más de un 50% de la capacidad antioxidante la concede el ácido úrico y el aumento de éste está directamente relacionado con el aumento de los niveles de CAT. En este estudio atribuyen los niveles resultados elevados a una respuesta al grado de disfunción renal observado. En nuestro estudio, observamos una asociación de los niveles de CAT en suero con dos marcadores de la función renal, la creatinina y la urea, asemejándose a la explicación que los autores de este estudio dieron a sus resultados (352). Igualmente, nosotros observamos cómo aumenta la CAT al disminuir el pH y al aumentar la acidez, lo que también podría estar relacionado con los niveles ácido úrico.

Además, también observamos una asociación de los niveles de la CAT en suero con la mortalidad en el primer día de estancia en la UCI. No es la primera vez que se asocia la mortalidad con los niveles de CAT. Diversos estudios asocian niveles de la CAT en suero con la mortalidad, siendo los que fallecen los que mayores niveles presentan(350,351,353). A pesar de ello, existen estudios que dudan de la utilidad del uso de la CAT en el diagnóstico y pronóstico en la sepsis por no obtener resultados concluyentes. Por ejemplo, en el estudio de Doise y col. (243), se compararon tres grupos, uno de sanos, otro de sepsis y otro con *shock* séptico sin observarse diferencias entre grupos ni asociación con los marcadores de gravedad.

Aunque existen algunos resultados contradictorios en los estudios analizados; en general, se observa un aumento de los niveles de la CAT y una asociación con la mortalidad y severidad en los pacientes con *shock* séptico en comparación con controles sanos, debido a la respuesta generada por el organismo para compensar el aumento de radicales libres y el daño generado por el estrés oxidativo.

5.3.6. Evaluación de la necesidad de suplementación.

Según lo observado en nuestro estudio, los pacientes con *shock* séptico manifiestan acidosis piroglutámica que se correlaciona con bajos niveles de Glu que pueden medirse tanto en suero como en orina, y con la baja actividad de GPx en eritrocitos. Estos resultados pueden ser útiles en el empleo de los bajos niveles de Glu como un indicador del agotamiento de GSH que podría reponerse con la administración de NAC.

La NAC es la forma acetilada de la cisteína, por lo tanto, es menos tóxica que la cisteína. El grupo acetilo de la NAC la protege de la oxidación y de su dimerización, siendo además soluble en agua, y por tanto, la hace la forma más segura de administración parenteral. La NAC ha demostrado ser beneficiosa contra la inflamación y se ha considerado como un medicamento seguro con efectos protectores para la enfermedad de la sepsis (354–357), además de actuar como un producto de la cisteína y como un precursor de la GSH (358), y contribuyendo a eliminar los radicales libres.

La presencia de ROS y de estrés oxidativo durante la sepsis, especialmente en el *shock* séptico, ha llevado a varios estudios a evaluar el papel de la NAC como tratamiento adyuvante (309,359–364). Por lo tanto, junto con sus propiedades como antioxidante, la NAC también aumentará los niveles de GSH, posiblemente conservando o mejorando la función de la GPx-1 (365). Un reciente estudio de Peivandi (366), se observó un aumento de los niveles de la CAT y una disminución de malondialdehído tras realizar un tratamiento con NAC en pacientes con sepsis. Por otro lado, la GGT desempeña un papel clave en la homeostasis del GSH al descomponer el GSH extracelular y proporcionar cisteína al sustrato que limita la velocidad para la síntesis intracelular *de novo* del GSH. También se ha visto que la administración de NAC puede tener efectos beneficiosos en la microcirculación durante la sepsis por sus efectos vasodilatadores (367).

La NAC se utiliza como antídoto en la intoxicación aguda por paracetamol para contrarrestar el daño hepático generado. El paracetamol se elimina en hígado generando un metabolito intermediario tóxico, la acetilbenzoquinoneimida. La eliminación de este metabolito se lleva a cabo por la GSH, por lo tanto, la depleción de GSH es la que provoca el daño hepático. En la administración de la NAC conseguimos aportar la cisteína necesaria para la síntesis *de novo* de la GSH. De la misma manera se puede

extrapolar esta depleción de GSH ocurrida en la intoxicación por paracetamol en los pacientes que están sometidos a un estrés oxidativo como es el caso de nuestro estudio, en pacientes con *shock* séptico. Por otro lado, es importante suspender los medicamentos como el paracetamol o la flucoxacilina en pacientes que manifiestan acidemia piroglutámica en la UCI para no contribuir más al descenso de la GSH (338,344). Mullins (368), realiza un estudio en 23 pacientes con una sobredosis de acetaminofeno, midiendo los niveles de PiroGlu en el plasma de estos pacientes y observando que 6 pacientes tienen concentraciones normales de PiroGlu y los 17 restantes, valores ligeramente superiores a los valores de referencia. La clave de la controversia en torno a la administración de NAC en estos casos puede ser la siguiente: que estos pacientes hayan agotado el ATP y la última reacción del ciclo detallado (glutación sintetasa) sea limitante y no se sintetice el GSH, aunque haya cisteína presente.

La necesidad de una suplementación con GSH para contrarrestar el estrés oxidativo, se ve limitado por la baja biodisponibilidad de esta molécula. Se realizó un estudio para comparar la biodisponibilidad y el efecto sobre los marcadores del estrés oxidativo, así como la seguridad de un preparado sublingual de GSH con dos complementos nutricionales de uso habitual por vía oral de GSH y de NAC. El estudio consistió en un ensayo cruzado aleatorio en el que participaron 20 voluntarios durante tres semanas. Se observó que los pacientes que tomaron GSH por vía sublingual, obtuvieron niveles de GSH total y GSSH así como la relación GSH/GSSH ($p = 0.003$) aumentados, con respecto al grupo al que se le administró GSH por vía oral.

Se han probado otras terapias antioxidantes (369) y se ha demostrado que las administradas de manera específica a nivel mitocondrial pueden ser útiles en pacientes con sepsis y disfunción orgánica, aunque la administración y el acceso es más difícil (370). También se vio un aumento significativo ($p = 0.04$) de la vitamina E en plasma en aquellos pacientes que tomaron GSH por vía sublingual. En general, estos resultados demuestran una mejora en la biodisponibilidad y efectos beneficiosos en el estrés oxidativo de la forma sublingual en comparación con la administración oral de GSH o NAC (309). Por otro lado, se ha visto que el aporte de glutamina al paciente crítico produce efectos beneficiosos sin provocar efectos adversos (89,90). Sin embargo, otros estudios avalan que no se producen efectos beneficiosos al administrar glutamina en pacientes críticos (371). En otro estudio (372), se ha valorado el tratamiento de estos

pacientes con gamma-glutamilcisteína, un dipéptido intermedio de la ruta gamma-glutamil, posee propiedades antiinflamatorias.

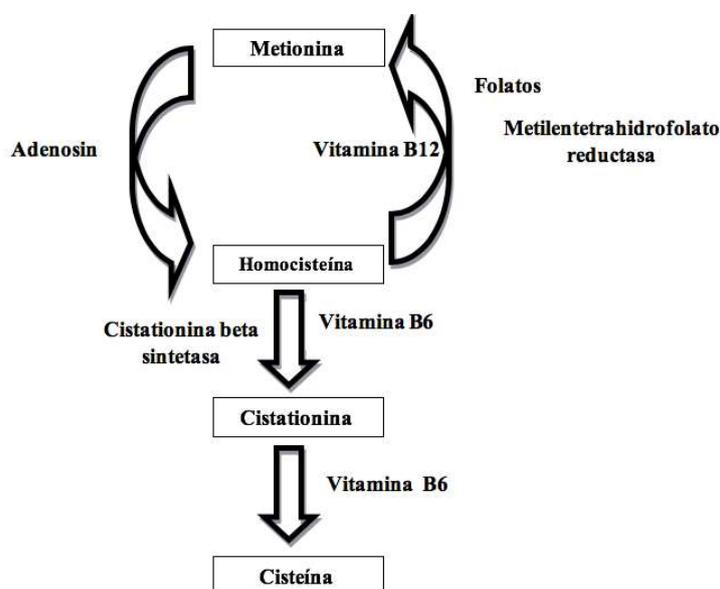
Cada vez más se va siguiendo un esquema de tratamiento personalizado de los pacientes con sepsis. No esperamos que la administración de NAC tenga efectos sobresalientes en la sepsis con una gran cantidad de anomalías bioquímicas y múltiples mecanismos fisiopatológicos subyacentes, pero sí obtengan una ayuda aquellos pacientes que sean susceptibles de sus beneficios, es decir, se aumentaría más la eficacia de la NAC en sepsis si se administrara a los pacientes con PiroGlu alto o GSH baja.

5.4. Evaluación de vitaminas y biomarcadores de morbimortalidad.

5.4.1. Alteración del ciclo de la homocisteína.

Como se puede observar en la **Figura 22**, también existe una alteración en los niveles de los componentes del ciclo de la homocisteína. Se ha encontrado que los niveles basales de homocisteína no están asociados con la gravedad y la mortalidad del paciente séptico (186,373), como se muestra en otros estudios. En este último estudio también se observa que la homocisteína no está involucrada en la gravedad del paciente con sepsis.

Figura 22. Ciclo de la homocisteína.



Un estudio de Tsantes et al.(186), observó que los niveles basales de homocisteína en pacientes con sepsis se encontraban dentro de los niveles normales, sin embargo, los niveles de Vit B12 fueron más altos, al igual que ocurre en nuestro estudio. De acuerdo con el ciclo de la homocisteína, su eliminación de la homocisteína se orienta hacia la formación de metionina a través del aumento de esta vitamina (Vit B12) y no hacia la formación de cisteína(186). Además, la evidencia epidemiológica indica que los pacientes con inflamación tienen niveles sanguíneos significativamente más bajos de piridoxal 5'-fosfato (vit B6) que los sujetos control (157,374,375). Según nuestro estudio, existe una correlación positiva entre los niveles de Glu en suero y Vit B12 sérica, es decir, la Glu se acumula cuando aumenta la Vit B12, ya que la cisteína no está disponible para que la gamma-glutamilcisteínasintetasa actúe para formar gamma-glutamilcisteína (**Figura 20**). Un estudio (376), reveló que "*los valores bajos de Glu y valores altos de metionina pueden ser factores pronósticos significativos de mortalidad ($p < 0,05$) en pacientes con sepsis*".

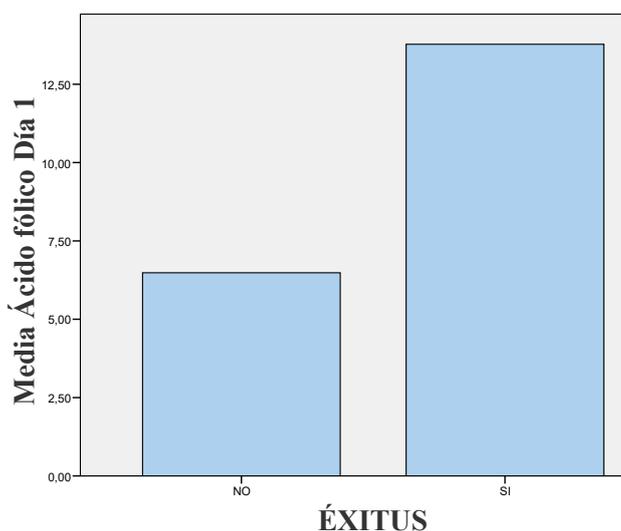
La cisteína proviene de la homocisteína y es necesaria para la formación de GSH. La homocisteína también interviene en la formación de metionina, para lo cual requiere Fol y Vit B12. Por lo tanto, la Vit B12 y el Fol intervienen en el paso de homocisteína a metionina. En paciente crítico se ha informado de una alta prevalencia de hiperhomocisteinemia (377). En algunos estudios se ha encontrado la homocisteína elevada en pacientes con sepsis grave en comparación con muestras de controles sanos (185). Se ha visto que un aporte de vitaminas del grupo B produce una disminución de la homocisteína en pacientes sanos pero con una leve hiperhomocisteinemia previa (378).

5.4.2. Evaluación de los resultados del estatus de la vitamina B12 y el ácido fólico.

La Vit B12 y el Fol son útiles como marcadores inflamatorios según este estudio. Podemos observar que la Vit B12 se ha elevado y los niveles de Fol están asociados con la mortalidad en pacientes con *shock* séptico. Es la primera vez que se realiza un estudio que consiste en la asociación del Fol con la morbimortalidad en pacientes con *shock* séptico, sin embargo, se ha documentado una asociación de los niveles de Fol bajos con la mortalidad de enfermedades cardiovasculares y cáncer (379).

La **Figura 23** representa la comparación de las medias de ácido fólico entre los pacientes fallecidos y no fallecidos en el primer día de estancia en la UCI.

Figura 23.- Comparación del ácido fólico en los pacientes con shock séptico con la mortalidad.



En un estudio de Erdem et al.(185), se midieron los niveles de Vit B12 y Fol en pacientes con sepsis severa y no hubo diferencias significativas con el grupo de controles sanos. En otro estudio similar, se midieron las concentraciones de Vit B12 y de Fol en pacientes con sepsis severa, observándose resultados similares a los nuestros, es decir, obtuvieron unos altos niveles de Vit B12 y unos niveles de Fol dentro de los valores de normalidad (186).

Los niveles elevados en sangre de Vit B12 están asociados con enfermedades inflamatorias (380). En un estudio realizado a pacientes críticos se observó que la Vit B12 estaba significativamente asociada a los niveles de PCR en el día uno ($p = 0.002$) y en el día dos ($p = 0.04$) de ingreso en UCI, y a la escala SOFA en el segundo día ($p = 0.04$) y en el cuarto día ($p = 0.02$) de ingreso en UCI (179). En otro estudio se vio también una asociación significativa de los niveles de Vit B12 con los niveles de PCR ($p < 0.001$) en paciente crítico (152). Según los resultados obtenidos, los niveles de Vit B12 se puede considerar como un predictor de la morbilidad del paciente. Además, en este estudio también se vio una asociación negativa estadísticamente

significativa entre los niveles de PCR, y los niveles de vitamina A y de vitamina E ($r = -0.541$ y $r = -0.299$, $p = 0.001$ y $p = 0.007$, respectivamente) (152). Otros estudios avalan la asociación de los niveles altos de Vit B12 con la morbimortalidad del paciente crítico, encontrándose niveles más altos de Vit B12 en los pacientes críticos que fallecieron durante su estancia hospitalaria, en comparación con los que no fallecieron ($p < 0.01$) (381,382).

Cuando se han analizado los niveles de Fol en pacientes sépticos, se ha visto que no hay diferencias significativas con respecto a los controles sanos(185,383). En otro estudio se observa que el 65% de los pacientes críticos ingresados en la UCI habían disminuido los niveles de Fol (< 3.4 ng/mL), y 24 horas después se observó que había una disminución significativa en los niveles de Fol en suero(184). En algunos estudios, cuando se analizó el Fol en pacientes sépticos y se comparó con pacientes sanos, se encontró que no había diferencias significativas entre el paciente séptico y los pacientes control (185,186). Por otro lado, otro estudio evaluó una muestra de 105 pacientes críticos y se vio que el 19% presentaba una deficiencia de Fol (< 2.7 ng/mL) al ingreso en UCI, observándose una correlación negativa entre los niveles de folato y la gravedad clínica de los pacientes (187). En nuestro estudio, la media de Fol en el tercer día fue inferior a la del primer día, aunque se encuentra más elevado en los pacientes que fallecen. Se requieren más estudios para resolver la presente controversia.

Los niveles plasmáticos altos de Vit B12 se han relacionado con una deficiencia funcional de esta vitamina (384). Esto se fundamenta en que los niveles altos de Vit B12 no garantizan una funcionalidad normal de la vitamina, ya que pueden ser una consecuencia de niveles bajos dentro de la célula ocasionado por una salida de la Vit B12 desde la célula hasta el plasma. La evaluación del estado funcional de la Vit B12 solo se puede medir mediante la actividad enzimática de la enzima dependiente de cobalamina dentro de la célula (384). En nuestro estudio, los niveles de Vit B12 se considera un marcador de inflamación plasmático independientemente de cómo se encuentre la Vit B12 dentro de la célula. De la misma manera, esta explicación puede ser aplicada al Fol. Así, se explica el hecho de que Fol se encuentre elevado en plasma en algunos pacientes lo que no garantiza la funcionalidad del Fol, ya que realmente puede haber una deficiencia celular.

La metionina es necesaria para la síntesis de ADN, siendo favorable tanto para el Fol como para la Vit B12, y para la síntesis de leucocitos y hematíes necesarios para la defensa contra la infección. Un estudio (385), observó que los metabolitos de la metionina (S-adenosilmetionina y S-adenosilhomocisteína) están elevados y relacionados con los aspectos clínicos de la sepsis. Con esto intentamos explicar la importancia de la alteración de estas dos vitaminas, ya que se ven alteradas muchas vías de las que dependen y pueden perjudicar los resultados clínico-nutricionales del paciente.

5.4.3. Evaluación de los resultados de los niveles de vitamina D.

En nuestro estudio, se observan unos niveles bajos de Vit D en los pacientes con *shock* séptico al compararlos con los pacientes sanos. Según numerosos artículos, la suplementación con VitD tiene una serie de beneficios frente a las infecciones bacterianas. En un estudio realizado en pacientes sépticos(404), se observó cómo una suplementación con un bolo de 300,000 IU de VitD disminuía la mortalidad. El grupo de pacientes con sepsis tratado con Vit D tuvo una mortalidad de un 20.8%, y el grupo de pacientes con sepsis tratado con placebo tuvo una mortalidad del 50%. Diversos estudios apoyan efectos antimicrobianos e inmunomoduladores de una concentración sérica adecuada de la VitD (198,405,406).

Por otro lado, se ha estudiado el papel pronóstico de mortalidad de la vitamina D (198), observándose que los pacientes con sepsis y déficit de Vit D tienen un tiempo promedio de supervivencia menor que los pacientes que tienen niveles séricos suficientes de Vit D (> 30 ng/mL). En nuestro trabajo, no hemos observado una asociación de la Vit D con la mortalidad, aunque se podría observar si se aumentara el tamaño de la muestra. En cuanto a la implicación de la Vit D en las infecciones bacterianas, en un estudio adicional (407) se ha observado que la Vit D puede activar la catelicidina, que es un péptido antimicrobiano presente en los macrófagos y en los leucocitos polimorfonucleares que ayuda a combatir las infecciones tanto de gramnegativos como de grampositivos. Por otro lado, se ha visto que la suplementación con Vit D a pacientes críticos en la UCI, limita el uso de la PCT para hacer un seguimiento de la evolución de la gravedad del paciente (408).

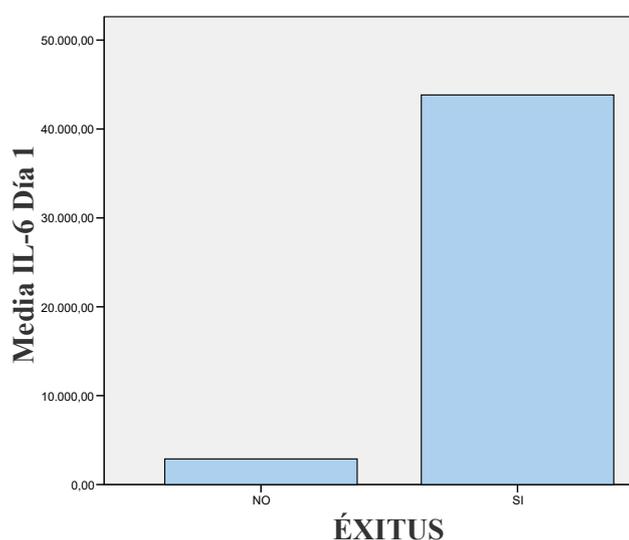
5.4.4. Evaluación de los resultados de inflamación.

5.4.4.1. Evaluación de los resultados de los niveles de interleucina-6.

En nuestro estudio, se observan que hay concentraciones elevadas de IL-6 en los pacientes con *shock* séptico. De igual manera, se ha visto en otros estudios que las concentraciones de la IL-6 se encuentran elevadas en estos pacientes, generalmente > 500 pg/mL de forma persistente (386,387). Los niveles de IL-6 aumentan antes que los niveles de PCT(388,389) y de PCR más fiebre (390).

Igualmente, también observamos una disminución la media de IL-6 al tercer día, al igual que el SOFA y la PCT. En cuanto a la comparación con los parámetros de morbimortalidad, se observa que hay una relación significativa con la mortalidad en aquellos pacientes que fallecen, presentando mayores niveles de IL-6, y actuando esta como un predictor de mortalidad (**Figura 24**). Esta figura representa la comparación de las medias de IL-6 entre los pacientes fallecidos y los no fallecidos en el primer día de estancia en la UCI.

Figura 24.- Comparación de la interleucina-6 en los pacientes con *shock* séptico con la mortalidad.



Para el estudio de la gravedad en un paciente con sepsis en la UCI, el estándar de oro es el parámetro SOFA. Sin embargo, se han venido estudiando posibles grupos de biomarcadores que evaluados en su conjunto pueden aumentar el rendimiento del

diagnóstico y la morbimortalidad. En este grupo de biomarcadores podemos incluir a la PCT y a la IL-6 (391). Se ha visto que la IL-6 es una interleucina importante en la reacción de fase aguda en respuesta a la sepsis (392). Sin embargo, la PCR no tiene tanta utilidad por la falta de especificidad (386). La PCT ha demostrado ser un biomarcador muy útil para el diagnóstico temprano de la sepsis (393).

En un estudio de seguimiento realizado a lo largo de 16 años se observa que los niveles de la IL-6 se asocian más con la mortalidad multicausal y la mortalidad relacionada por cáncer que la PCR, ya que esta solo predice la mortalidad cardiovascular. Además, en el mismo estudio se comprueba a corto plazo (5 años) que los niveles de la IL-6 y los niveles de la PCR están más fuertemente asociados a la mortalidad que el Anion GAP (394), al igual que en nuestro estudio. En un estudio muy similar a nuestro estudio, se estudia la IL-6 como predictora de la mortalidad a las 72 horas. Aunque no se observan diferencias en los niveles de IL-6 entre los grupos de pacientes sépticos que fallecen y los que no fallecen, si se observa un aumento significativo de los niveles de la IL-6 a las 72 horas en aquellos pacientes que fallecen (395). Por otro lado, otro estudio (396) mostró que los niveles de la IL-6 predice mejor que la PCT o la PCR el éxito del tratamiento en pacientes con sepsis no quirúrgica predominantemente en las primeras 48-72 horas. En este sentido, un estudio de metaanálisis (397) muestra a la IL-6 es un marcador muy valioso para predecir la sepsis neonatal.

Otro metaanálisis (398) estudió una muestra de 2680 pacientes procedentes de 22 estudios observando la utilidad diagnóstica de la IL-6, PCT y PCR en pacientes con sepsis y SRIS. La sensibilidad/especificidad agrupadas de IL-6 y PCT fueron de 0.68/0.73 y 0.78/0.67, respectivamente, y el área bajo la curva de IL-6, PCT y PCR para el diagnóstico de sepsis fue de 0.80, 0.83 y 0.71, respectivamente. Por lo tanto, en este estudio se pone de manifiesto que el rendimiento diagnóstico para diferenciar el SRIS de la sepsis es muy parecido en el caso de la PCT y la IL-6 y superior que la PCR, recomendando también el empleo de la IL-6 para confirmar la infección en diagnóstico de sepsis en un paciente con SRIS. Además, La elevación persistente de la concentración de la PCR en pacientes que han sobrevivido a una sepsis, se ha relacionado con peores resultados clínicos y una mayor mortalidad a largo plazo (399).

5.4.4.2. Evaluación de los resultados sobre los niveles de ácido láctico y de procalcitonina.

El ácido láctico está incluido en la definición de sepsis y *shock* séptico en el Consenso Internacional SEPIS-III del 2016 (9). Al igual que en nuestro estudio, otro trabajo habla del ácido láctico como predictor de mortalidad en pacientes con infección en la unidad de urgencias (400). Igualmente, se ha confirmado la utilidad en la monitorización del tratamiento, recomendándose en caso de *shock* séptico cuando el ácido láctico está muy elevado (401). Además, se ha observado que cuando los niveles de ácido láctico están muy elevados, las medidas seriadas del aclaramiento de lactato ayudan en la predicción de la morbimortalidad. El aclaramiento en las primeras 24 horas está asociado con la mejoría de los pacientes, y cuanto más aclaramiento de ácido láctico había mayor era la mejoría del paciente (167). De la misma manera, el aclaramiento de ácido láctico en una muestra de 90 pacientes (medidos al ingreso y a las 6 horas) puede predecir una mayor tasa de disfunción orgánica y mortalidad (9). En definitiva este biomarcador ha demostrado tener una utilidad para el diagnóstico, pronóstico y evolución del paciente séptico.

Por otro lado, la PCT también ha demostrado ser un marcador útil para el diagnóstico temprano de la sepsis e infecciones locales, y posiblemente podría conducir a una menor mortalidad del paciente causada por infecciones (316). De hecho, en un reciente estudio (402), se observó que los niveles de la PCT tuvieron una mayor utilidad predictiva que los valores de ácido láctico en pacientes con sepsis. En 165 casos con cuadro de sepsis, la concentración de la PCT tuvo una sensibilidad del 89.7% en comparación con la sensibilidad del ácido láctico (64.9%).

En resumen, después de las numerosas investigaciones realizadas sobre el tema, a día de hoy aun no se ha conseguido encontrar un biomarcador que diagnostique con precisión la sepsis (403).

5.5. Resumen de los resultados más importantes.

En definitiva, los pacientes con *shock* séptico manifiestan acidosis pirolutámica que correlaciona con bajos niveles de Glu (excepto Glu en orina/creatinina) lo cual puede ser medido tanto en suero como en orina, al igual que con bajos niveles en la

actividad de GPx1/Hb. Los niveles de Glu están relacionados con parámetros de severidad y con los niveles de Vit B12, aunque esta relación no se observa en el caso del PiroGlu, ni de la GPx1.

La mayor contribución de este estudio es el fortalecimiento de la evidencia para apoyar el control de los pacientes con acidosis piroglutámica, además de proponer al PiroGlu como un biomarcador potencial frente al estrés oxidativo. Nuestros resultados pueden dar luz a futuras investigaciones que reconozcan el aumento de acidosis piroglutámica como un indicador de la depleción de GSH.

En cuanto a las vitaminas, pudimos comprobar que existe una relación del ácido fólico con la mortalidad y con los días de ventilación mecánica, así como los niveles de la IL-6 también están asociados a la mortalidad y correlacionan con otros biomarcadores de gravedad. Este estudio muestra que los niveles de ácido fólico y de IL-6 en la admisión y a las 72 horas de la hospitalización podrían proporcionar información de pronóstico en pacientes con *shock* séptico.

5.6. Limitaciones del estudio.

La principal limitación de este estudio ha sido el número de muestra que hemos podido conseguir. Tuvimos una dedicación de dos años para reunir los 28 casos, y nos ha resultado muy difícil encontrar con pacientes con esta gravedad en la UCI y con pacientes que cumplan los criterios específicos establecidos, y es por ello que no hemos conseguido más muestra.

Es difícil obtener muestras de estos pacientes, no solo por la dificultad de encontrar casos tan graves, si no por el ambiente familiar y social que conlleva. Es difícil explicar y pedir colaboración en un momento tan crítico a las familias de estos pacientes, porque su ser querido se está debatiendo entre la vida y la muerte, y no saben responder ante una demanda de corroboración además muy precipitada, porque la extracción de las muestras se hacen en el momento de mayor crisis, en el momento del *shock* séptico. Los consentimientos informados no podían ser firmados por los pacientes porque se encontraban sedados y tuvieron que hacerse cargo los familiares. De hecho, hubo casos perdidos por no conseguir obtener el consentimiento informado.

De los 28 casos obtenidos, algunos mueren antes de los 3 días, y otros, son dados de alta en la UCI y llevados a otras plantas, lo que hace que perdamos al paciente y no podamos hacerle la segunda extracción para el estudio.

Con respecto al método utilizado para determinar los componentes de la ruta del glutatión no disponíamos de valores de referencia por no encontrarse en ese momento la determinación estandarizada. Tuvimos que comparar los resultados con una muestra de pacientes sanos que utilizamos como controles.

Otra limitación de este estudio ha sido que no hemos podido disponer de ninguna financiación, solo una pequeña ayuda por parte de una empresa: Astellas Pharma S.A. La falta de recursos nos ha limitado de la posibilidad de ser más ambiciosos y poder complementar los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

6. Conclusiones.

Tras la realización, obtención de resultados y discusión de este estudio, se obtuvieron una serie de conclusiones que responden a los objetivos generales y específicos formulados. Las conclusiones son las siguientes:

1. En general, los pacientes críticos de nuestro estudio presentan unas características clínicas que confirman su situación hipercatabólica e inflamatoria que determinan su estado de gravedad desde el inicio de la estancia en UCI.

2. En los pacientes críticos con *shock* séptico estudiados hemos encontrado una prevalencia del 85% de acidemia piroglutámica y del 65 % de acidosis urinaria, lo que podría sugerir su utilidad como predictores de agotamiento de GSH.

3. Nuestros resultados muestran que los componentes de la ruta gamma-glutamil están alterados, observándose niveles de PiroGlu elevados y niveles de Glu, lo que obedece a un bloqueo en la ruta por falta de ATP, provocando que no haya GPx suficiente disponible que pudiera el estrés oxidativo en estos pacientes.

4. Los niveles de PiroGlu se encontraron correlacionados positivamente con los niveles de Glu tanto en suero como en orina durante todo el periodo de estudio. Éste estrecho vínculo entre ambos parámetros sugiere que su determinación en muestras de orina, por ser obtenida de manera menos invasiva, podrían ser biomarcadores mas recomendados y útiles en nuestros pacientes con *shock* séptico.

5. El aumento de la CAT se asocia con los niveles de PiroGlu y de Glu, posiblemente como respuesta a un aumento de estrés oxidativo que presentan nuestros pacientes con *shock* séptico durante el periodo de estancia en UCI registrado.

6. El 63% de los pacientes con *shock* séptico estudiados presentaba deficiencia de selenio plasmático, lo que puede contribuir a disminuir la síntesis de la GPx.

7. Los resultados de nuestro estudio muestran que los pacientes con *shock* séptico tienen niveles de Vit B12 elevados y éstos están asociados con los niveles de Glu en suero y en orina desde el primer día de estancia en UCI, lo que confirma su dependencia en esta ruta metabólica.

8. Los pacientes con *shock* séptico incluidos tienen en general déficit de Vit D, que provoca que ésta no pueda contribuir como antioxidante a la disminución del estrés oxidativo durante el periodo de estancia.

9. La IL-6 como biomarcador de inflamación, se encuentra elevada en pacientes con *shock* séptico y se encuentra directamente correlacionada con marcadores de gravedad en la sepsis, como el ácido láctico, el anión GAP y la TTPA.

10. El Glu, la CAT, el Fol y la IL-6 están relacionados con parámetros bioquímicos de gravedad, con marcadores clínicos y/o con escalas de gravedad, por lo tanto pueden ser utilizados como biomarcadores, tanto diagnóstico como pronóstico de sepsis.

11. Según nuestros resultados, la CAT, el Fol y la IL-6 podrían ser buenos predictores de mortalidad, teniendo en cuenta que se observa una asociación significativa entre ellos en los pacientes con *shock* séptico.

12. Teniendo en cuenta la evolución del paciente con *shock* séptico, observamos que a los tres días se estancia los valores de PiroGlu y Glu en orina, así como la GPx están elevados y los niveles de Se y de IL-6 disminuidos lo que indica un empeoramiento del paciente durante la estancia en la UCI.

13. **Conclusión final:** La mayor contribución de este estudio es el fortalecimiento de la evidencia para apoyar la monitorización de los pacientes con acidosis piroglutámica, además de proponer al PiroGlu como un biomarcador potencial para probar o medir el estrés oxidativo. Estos resultados pueden ofrecer nuevos datos que pueden conducir estudios futuros en el reconocimiento de aumento de acidosis piroglutámica como un indicador de la depleción de GSH, destacando que estos pacientes podrían ser susceptibles de beneficiarse con un tratamiento con acetilcisteína, lo que se propone para un estudio posterior dentro de nuestra línea de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referencias bibliográficas.

1. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* junio de 1992;20(6):864-74.
2. Mansilla, E. C., Moreno, R. C., Díaz, J. C. R., Serrano, M. D. R. G., Escartín, N. L., & Arriaza, M. M. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia62.pdf>
3. Wilmore DW. Metabolic response to severe surgical illness: overview. *World J Surg.* junio de 2000;24(6):705-11.
4. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, 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.* junio de 1992;101(6):1644-55.
5. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* julio de 1996;22(7):707-10.
6. Raith EP, Udy AA, Bailey M, McGloughlin S, MacIsaac C, Bellomo R, et al. Prognostic Accuracy of the SOFA Score, SIRS Criteria, and qSOFA Score for In-Hospital Mortality Among Adults With Suspected Infection Admitted to the Intensive Care Unit. *JAMA.* 17 de 2017;317(3):290-300.
7. Minne L, Abu-Hanna A, de Jonge E. Evaluation of SOFA-based models for predicting mortality in the ICU: A systematic review. *Crit Care Lond Engl.* 2008;12(6):R161.
8. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* abril de 2003;31(4):1250-6.

9. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 23 de febrero de 2016;315(8):801-10.
10. Czura CJ. “Merinoff Symposium 2010: Sepsis”—Speaking with One Voice. *Mol Med* [Internet]. 2011;17(1-2):2-3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022986/>
11. Eriksson J, Eriksson M, Brattström O, Hellgren E, Friman O, Gidlöf A, et al. Comparison of the sepsis-2 and sepsis-3 definitions in severely injured trauma patients. *J Crit Care*. 9 de agosto de 2019;54:125-9.
12. Besen BAMP, Romano TG, Nassar AP, Taniguchi LU, Azevedo LCP, Mendes PV, et al. Sepsis-3 definitions predict ICU mortality in a low-middle-income country. *Ann Intensive Care*. diciembre de 2016;6(1):107.
13. Giamarellos-Bourboulis EJ, Tsaganos T, Tsangaris I, Lada M, Routsis C, Sinapidis D, et al. Validation of the new Sepsis-3 definitions: proposal for improvement in early risk identification. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. febrero de 2017;23(2):104-9.
14. Cheng B, Li Z, Wang J, Xie G, Liu X, Xu Z, et al. Comparison of the Performance Between Sepsis-1 and Sepsis-3 in ICUs in China: A Retrospective Multicenter Study. *Shock Augusta Ga*. 2017;48(3):301-6.
15. Fang X, Wang Z, Yang J, Cai H, Yao Z, Li K, et al. Clinical Evaluation of Sepsis-1 and Sepsis-3 in the ICU. *Chest*. mayo de 2018;153(5):1169-76.
16. Khwannimit B, Bhurayanontachai R, Vattanavanit V. Comparison of the performance of SOFA, qSOFA and SIRS for predicting mortality and organ failure among sepsis patients admitted to the intensive care unit in a middle-income country. *J Crit Care*. 2018;44:156-60.
17. Estenssoro E, Kanoore Edul VS, Loudet CI, Osatnik J, Ríos FG, Vázquez DN, et al. Predictive Validity of Sepsis-3 Definitions and Sepsis Outcomes in Critically Ill Patients: A Cohort Study in 49 ICUs in Argentina. *Crit Care Med*. 2018;46(8):1276-83.
18. Shankar-Hari M, Harrison DA, Rubenfeld GD, Rowan K. Epidemiology of sepsis and septic shock in critical care units: comparison between sepsis-2 and sepsis-3 populations using a national critical care database. *Br J Anaesth*. 1 de octubre de 2017;119(4):626-36.

19. Donnelly JP, Safford MM, Shapiro NI, Baddley JW, Wang HE. Application of the Third International Consensus Definitions for Sepsis (Sepsis-3) Classification: a retrospective population-based cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(6):661-70.
20. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. diciembre de 2013;13(12):862-74. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4077177/>
21. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 29 de agosto de 2013;369(9):840-51.
22. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*. 1 de enero de 2014;5(1):36-44.
23. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. *Immunity* [Internet]. 17 de abril de 2014 [citado 22 de abril de 2018];40(4):463-75. Disponible en: [http://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613\(14\)00115-0](http://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613(14)00115-0)
24. Singer M, Santis VD, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *The Lancet* [Internet]. 7 de agosto de 2004 [citado 22 de abril de 2018];364(9433):545-8. Disponible en: [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(04\)16815-3/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(04)16815-3/abstract)
25. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* [Internet]. 1 de julio de 1999 [citado 22 de abril de 2018];27(7):1230-51. Disponible en: <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=10446814>
26. Rhee C, Jentsch MS, Kadri SS, Seymour CW, Angus DC, Murphy DJ, et al. Variation in Identifying Sepsis and Organ Dysfunction Using Administrative Versus Electronic Clinical Data and Impact on Hospital Outcome Comparisons. *Crit Care Med*. abril de 2019;47(4):493-500.
27. Whittaker S-A, Mikkelsen ME, Gaieski DF, Koshy S, Kean C, Fuchs BD. Severe sepsis cohorts derived from claims-based strategies appear to be biased toward a more severely ill patient population. *Crit Care Med*. abril de 2013;41(4):945-53.
28. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus

Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 23 de febrero de 2016;315(8):762-74.

29. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 23 de febrero de 2016;315(8):775-87.
30. Salomão R, Ferreira BL, Salomão MC, Santos SS, Azevedo LCP, Brunialti MKC. Sepsis: evolving concepts and challenges. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol*. 2019;52(4):e8595.
31. Verboom DM, Frencken JF, Ong DSY, Horn J, van der Poll T, Bonten MJM, et al. Robustness of sepsis-3 criteria in critically ill patients. *J Intensive Care* [Internet]. 29 de agosto de 2019 [citado 12 de septiembre de 2019];7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6716896/>
32. Shankar-Hari M, Harrison DA, Rowan KM. Differences in Impact of Definitional Elements on Mortality Precludes International Comparisons of Sepsis Epidemiology-A Cohort Study Illustrating the Need for Standardized Reporting. *Crit Care Med*. diciembre de 2016;44(12):2223-30.
33. Klein Klouwenberg PMC, Ong DSY, Bonten MJM, Cremer OL. Classification of sepsis, severe sepsis and septic shock: the impact of minor variations in data capture and definition of SIRS criteria. *Intensive Care Med*. mayo de 2012;38(5):811-9.
34. Kaukonen K-M, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med*. 23 de abril de 2015;372(17):1629-38.
35. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. abril de 2003;31(4):1250-6.
36. Gül F, Arslantaş MK, Cinel İ, Kumar A. Changing Definitions of Sepsis. *Turk J Anaesthesiol Reanim*. junio de 2017;45(3):129-38.
37. Kraut JA, Madias NE. Lactic Acidosis. *N Engl J Med* [Internet]. 11 de diciembre de 2014;371(24):2309-19. Disponible en: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1309483>

38. Casserly B, Phillips GS, Schorr C, Dellinger RP, Townsend SR, Osborn TM, et al. Lactate Measurements in Sepsis-induced Tissue Hypoperfusion: Results From the Surviving Sepsis Campaign Database*. Crit Care Med [Internet]. 1 de marzo de 2015 [citado 22 de abril de 2018];43(3):567-73. Disponible en: <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=25479113>
39. Cecconi M, De Backer D, Antonelli M, Beale R, Bakker J, Hofer C, et al. Consensus on circulatory shock and hemodynamic monitoring. Task force of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med [Internet]. 2014;40(12):1795-815. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4239778/>
40. Borges Sá M, Candel González FJ, Ferrer Roca R, Vidal Cortés P, Zaragoza Crespo R. Código sepsis: Documento de consenso [Internet]. IMC; 2014 [citado 24 de abril de 2018]. 85 p. Disponible en: <https://www.seguridaddelpaciente.es/es/informacion/publicaciones/2016/codigo-sepsis-documento-de-consenso/>
41. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2016. Crit Care Med [Internet]. marzo de 2017 [citado 19 de abril de 2018];45(3):486. Disponible en: https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2017/03000/Surviving_Sepsis_Campaign_International.15.aspx
42. Julián-Jiménez A, Candel-González FJ, González del Castillo J. Utilidad de los biomarcadores de inflamación e infección en los servicios de urgencias. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica [Internet]. 1 de marzo de 2014;32(3):177-90. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X13000104>
43. Schmid A, Pugin J, Chevrolet J-C, Marsch S, Ludwig S, Stocker R, et al. Burden of illness imposed by severe sepsis in Switzerland. Swiss Med Wkly. 21 de febrero de 2004;134(7-8):97-102.
44. Brun-Buisson C, Roudot-Thoraval F, Girou E, Grenier-Sennelier C, Durand-Zaleski I. The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis. Intensive Care Med. septiembre de 2003;29(9):1464-71.
45. Bengmark S. Pro- and Synbiotics to Prevent Sepsis in Major Surgery and Severe Emergencies. Nutrients [Internet]. 17 de febrero de 2012 [citado 14 de mayo de 2018];4(2):100-11.

2019];4(2):91-111.

Disponible

en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3296993/>

46. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* febrero de 2006;34(2):344-53.
47. Danai P, Martin GS. Epidemiology of sepsis: recent advances. *Curr Infect Dis Rep.* septiembre de 2005;7(5):329-34.
48. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 2 de diciembre de 2009;302(21):2323-9.
49. Gerlach H, Keh D. Recent progress in sepsis epidemiology--have we learned enough? *Crit Care Lond Engl.* octubre de 2003;7(5):333-4.
50. de Miguel-Yanes JM, Méndez-Bailón M, Jiménez-García R, Hernández-Barrera V, Pérez-Farinós N, López-de-Andrés A. Trends in sepsis incidence and outcomes among people with or without type 2 diabetes mellitus in Spain (2008-2012). *Diabetes Res Clin Pract.* diciembre de 2015;110(3):266-75.
51. Levy MM, Rhodes A, Phillips GS, Townsend SR, Schorr CA, Beale R, et al. Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Crit Care Med.* enero de 2015;43(1):3-12.
52. Danai PA, Moss M, Mannino DM, Martin GS. The epidemiology of sepsis in patients with malignancy. *Chest.* junio de 2006;129(6):1432-40.
53. Bouza C, López-Cuadrado T, Saz-Parkinson Z, Amate-Blanco JM. Epidemiology and recent trends of severe sepsis in Spain: a nationwide population-based analysis (2006-2011). *BMC Infect Dis.* 21 de diciembre de 2014;14:3863.
54. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med.* mayo de 2007;35(5):1244-50.
55. Esper AM, Moss M, Lewis CA, Nisbet R, Mannino DM, Martin GS. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Crit Care Med.* octubre de 2006;34(10):2576-82.

-
56. Mayr FB, Yende S, Linde-Zwirble WT, Peck-Palmer OM, Barnato AE, Weissfeld LA, et al. Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA*. 23 de junio de 2010;303(24):2495-503.
57. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Occurrence and outcomes of sepsis: influence of race. *Crit Care Med*. marzo de 2007;35(3):763-8.
58. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 8 de noviembre de 2001;345(19):1368-77.
59. Delaney AP, Dan A, McCaffrey J, Finfer S. The role of albumin as a resuscitation fluid for patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*. febrero de 2011;39(2):386-91.
60. Guidet B, Martinet O, Boulain T, Philippart F, Poussel JF, Maizel J, et al. Assessment of hemodynamic efficacy and safety of 6% hydroxyethylstarch 130/0.4 vs. 0.9% NaCl fluid replacement in patients with severe sepsis: The CRYSTMAS study. *Crit Care* [Internet]. 2012;16(3):R94. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3580640/>
61. Murphy CV, Schramm GE, Doherty JA, Reichley RM, Gajic O, Afessa B, et al. The Importance of Fluid Management in Acute Lung Injury Secondary to Septic Shock. *CHEST* [Internet]. 1 de julio de 2009 [citado 25 de abril de 2018];136(1):102-9. Disponible en: [https://journal.chestnet.org/article/S0012-3692\(09\)60410-4/fulltext](https://journal.chestnet.org/article/S0012-3692(09)60410-4/fulltext)
62. Backer DD, Aldecoa C, Njimi H, Vincent J. Dopamine versus norepinephrine in the treatment of septic shock: A meta-analysis*. *Crit Care Med* [Internet]. 1 de marzo de 2012 [citado 25 de abril de 2018];40(3):725-30. Disponible en: <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=22036860>
63. Myburgh JA, Higgins A, Jovanovska A, Lipman J, Ramakrishnan N, Santamaria J, et al. A comparison of epinephrine and norepinephrine in critically ill patients. *Intensive Care Med* [Internet]. 1 de diciembre de 2008 [citado 25 de abril de 2018];34(12):2226. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00134-008-1219-0>
64. Russell JA. Bench-to-bedside review: Vasopressin in the management of septic shock. *Crit Care* [Internet]. 2011;15(4):226. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3387647/>

65. Morelli A, Ertmer C, Rehberg S, Lange M, Orecchioni A, Laderchi A, et al. Phenylephrine versus norepinephrine for initial hemodynamic support of patients with septic shock: a randomized, controlled trial. *Crit Care* [Internet]. 2008;12(6):R143. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2646303/>
66. Jain G, Singh DK. Comparison of phenylephrine and norepinephrine in the management of dopamine-resistant septic shock. *Indian J Crit Care Med Peer-Rev Off Publ Indian Soc Crit Care Med* [Internet]. 2010;14(1):29-34. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2888327/>
67. De Backer D, Creteur J, Dubois M-J, Sakr Y, Koch M, Verdant C, et al. The effects of dobutamine on microcirculatory alterations in patients with septic shock are independent of its systemic effects. *Crit Care Med*. febrero de 2006;34(2):403-8.
68. Annane D, Bellissant E, Bollaert P-E, Briegel J, Confalonieri M, Gaudio RD, et al. Corticosteroids in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock in Adults: A Systematic Review. *JAMA* [Internet]. 10 de junio de 2009 [citado 26 de abril de 2018];301(22):2362-75. Disponible en: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/184029>
69. Minneci PC, Deans KJ, Eichacker PQ, Natanson C. The effects of steroids during sepsis depend on dose and severity of illness: an updated meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. abril de 2009;15(4):308-18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3383780/>
70. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, et al. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med*. 10 de enero de 2008;358(2):111-24.
71. Patel GP, Balk RA. Systemic steroids in severe sepsis and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de enero de 2012;185(2):133-9.
72. Sligl WI, Milner DA, Sundar S, Mphatswe W, Majumdar SR. Safety and efficacy of corticosteroids for the treatment of septic shock: A systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 de julio de 2009;49(1):93-101.
73. Weber-Carstens S, Deja M, Bercker S, Dimroth A, Ahlers O, Kaisers U, et al. Impact of bolus application of low-dose hydrocortisone on glycemic control in septic shock patients. *Intensive Care Med*. abril de 2007;33(4):730-3.

74. Annane D, Sébille V, Charpentier C, Bollaert P-E, François B, Korach J-M, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA*. 21 de agosto de 2002;288(7):862-71.
75. Domenighetti G, Moccia A, Gayer R. Observational case-control study of non-invasive ventilation in patients with ARDS. *Monaldi Arch Chest Dis Arch Monaldi Mal Torace*. marzo de 2008;69(1):5-10.
76. Rana S, Jenad H, Gay PC, Buck CF, Hubmayr RD, Gajic O. Failure of non-invasive ventilation in patients with acute lung injury: observational cohort study. *Crit Care Lond Engl*. 2006;10(3):R79.
77. Antonelli M, Conti G, Esquinas A, Montini L, Maggiore SM, Bello G, et al. A multiple-center survey on the use in clinical practice of noninvasive ventilation as a first-line intervention for acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. enero de 2007;35(1):18-25.
78. Antonelli M, Conti G, Bufi M, Costa MG, Lappa A, Rocco M, et al. Noninvasive ventilation for treatment of acute respiratory failure in patients undergoing solid organ transplantation: a randomized trial. *JAMA*. 12 de enero de 2000;283(2):235-41.
79. Hilbert G, Gruson D, Vargas F, Valentino R, Gbikpi-Benissan G, Dupon M, et al. Noninvasive ventilation in immunosuppressed patients with pulmonary infiltrates, fever, and acute respiratory failure. *N Engl J Med*. 15 de febrero de 2001;344(7):481-7.
80. Curtis JR, Cook DJ, Sinuff T, White DB, Hill N, Keenan SP, et al. Noninvasive positive pressure ventilation in critical and palliative care settings: understanding the goals of therapy. *Crit Care Med*. marzo de 2007;35(3):932-9.
81. Yeow M-E, Santanilla JI. Noninvasive positive pressure ventilation in the emergency department. *Emerg Med Clin North Am*. agosto de 2008;26(3):835-47, x.
82. Payen D, Mateo J, Cavaillon JM, Fraise F, Floriot C, Vicaut E, et al. Impact of continuous venovenous hemofiltration on organ failure during the early phase of severe sepsis: a randomized controlled trial. *Crit Care Med*. marzo de 2009;37(3):803-10.
83. Ortiz Leyba C, Montejo González JC, Vaquerizo Alonso C, Spanish Society of Intensive Care Medicine and Coronary Units-Spanish Society of Parenteral and Enteral Nutrition (SEMICYUC-SENPE). [Guidelines for specialized nutritional and metabolic support in the critically-ill patient. Update. Consensus of the Spanish Society of Intensive Care

Medicine and Coronary Units-Spanish Society of Parenteral and Enteral Nutrition (SEMICYUC-SENPE): patient with sepsis]. *Med Intensiva*. noviembre de 2011;35 Suppl 1:72-6.

84. Gramlich L, Kichian K, Pinilla J, Rodych NJ, Dhaliwal R, Heyland DK. Does enteral nutrition compared to parenteral nutrition result in better outcomes in critically ill adult patients? A systematic review of the literature. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. octubre de 2004;20(10):843-8.
85. Kreymann KG, Berger MM, Deutz NEP, Hiesmayr M, Jolliet P, Kazandjiev G, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Intensive care. *Clin Nutr Edinb Scotl*. abril de 2006;25(2):210-23.
86. Singer P, Berger MM, Van den Berghe G, Biolo G, Calder P, Forbes A, et al. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: intensive care. *Clin Nutr Edinb Scotl*. agosto de 2009;28(4):387-400.
87. Marik PE, Preiser J-C. Toward understanding tight glycemic control in the ICU: a systematic review and metaanalysis. *Chest*. marzo de 2010;137(3):544-51.
88. Park S, Kim D-G, Suh GY, Kang JG, Ju Y-S, Lee Y-J, et al. Mild hypoglycemia is independently associated with increased risk of mortality in patients with sepsis: a 3-year retrospective observational study. *Crit Care Lond Engl*. 12 de octubre de 2012;16(5):R189.
89. Déchelotte P, Hasselmann M, Cynober L, Allaouchiche B, Coëffier M, Heeketsweiler B, et al. L-alanyl-L-glutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: the French controlled, randomized, double-blind, multicenter study. *Crit Care Med*. marzo de 2006;34(3):598-604.
90. Grau T, Bonet A, Miñambres E, Piñeiro L, Irlés JA, Robles A, et al. The effect of L-alanyl-L-glutamine dipeptide supplemented total parenteral nutrition on infectious morbidity and insulin sensitivity in critically ill patients. *Crit Care Med*. junio de 2011;39(6):1263-8.
91. Ziegler TR, Ogden LG, Singleton KD, Luo M, Fernandez-Estivariz C, Griffith DP, et al. Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. *Intensive Care Med*. agosto de 2005;31(8):1079-86.

92. Heller AR, Rössler S, Litz RJ, Stehr SN, Heller SC, Koch R, et al. Omega-3 fatty acids improve the diagnosis-related clinical outcome. *Crit Care Med.* abril de 2006;34(4):972-9.
93. Friesecke S, Lotze C, Köhler J, Heinrich A, Felix SB, Abel P. Fish oil supplementation in the parenteral nutrition of critically ill medical patients: a randomised controlled trial. *Intensive Care Med.* agosto de 2008;34(8):1411-20.
94. Barbosa VM, Miles EA, Calhau C, Lafuente E, Calder PC. Effects of a fish oil containing lipid emulsion on plasma phospholipid fatty acids, inflammatory markers, and clinical outcomes in septic patients: a randomized, controlled clinical trial. *Crit Care Lond Engl.* 2010;14(1):R5.
95. Galbán C, Montejo JC, Mesejo A, Marco P, Celaya S, Sánchez-Segura JM, et al. An immune-enhancing enteral diet reduces mortality rate and episodes of bacteremia in septic intensive care unit patients. *Crit Care Med.* marzo de 2000;28(3):643-8.
96. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 17 de octubre de 2001;286(15):1869-78.
97. Werdan K, Pilz G, Bujdoso O, Fraunberger P, Neeser G, Schmieder RE, et al. Score-based immunoglobulin G therapy of patients with sepsis: the SBITS study. *Crit Care Med.* diciembre de 2007;35(12):2693-701.
98. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 de octubre de 2009;180(7):640-8.
99. Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, et al. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med.* agosto de 2014;42(8):1749-55.
100. Paul M, Shani V, Muchtar E, Kariv G, Robenshtok E, Leibovici L. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. *Antimicrob Agents Chemother.* noviembre de 2010;54(11):4851-63.

101. Klastersky J. Management of fever in neutropenic patients with different risks of complications. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 de julio de 2004;39 Suppl 1:S32-37.
102. Kumar A, Safdar N, Kethireddy S, Chateau D. A survival benefit of combination antibiotic therapy for serious infections associated with sepsis and septic shock is contingent only on the risk of death: a meta-analytic/meta-regression study. *Crit Care Med.* agosto de 2010;38(8):1651-64.
103. Kumar A, Zarychanski R, Light B, Parrillo J, Maki D, Simon D, et al. Early combination antibiotic therapy yields improved survival compared with monotherapy in septic shock: a propensity-matched analysis. *Crit Care Med.* septiembre de 2010;38(9):1773-85.
104. Varghese JM, Roberts JA, Lipman J. Antimicrobial pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the critically ill with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Clin.* enero de 2011;27(1):19-34.
105. Giner M, Laviano A, Meguid MM, Gleason JR. In 1995 a correlation between malnutrition and poor outcome in critically ill patients still exists. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* enero de 1996;12(1):23-9.
106. Norman K, Pichard C, Lochs H, Pirlich M. Prognostic impact of disease-related malnutrition. *Clin Nutr Edinb Scotl.* febrero de 2008;27(1):5-15.
107. Cartin-Ceba R, Afessa B, Gajic O. Low baseline serum creatinine concentration predicts mortality in critically ill patients independent of body mass index. *Crit Care Med.* octubre de 2007;35(10):2420-3.
108. Dvir D, Cohen J, Singer P. Computerized energy balance and complications in critically ill patients: an observational study. *Clin Nutr Edinb Scotl.* febrero de 2006;25(1):37-44.
109. Tremblay A, Bandi V. Impact of body mass index on outcomes following critical care. *Chest.* abril de 2003;123(4):1202-7.
110. Robinson MK, Mogensen KM, Casey JD, McKane CK, Moromizato T, Rawn JD, et al. The relationship among obesity, nutritional status, and mortality in the critically ill. *Crit Care Med.* enero de 2015;43(1):87-100.
111. Mogensen KM, Robinson MK, Casey JD, Gunasekera NS, Moromizato T, Rawn JD, et al. Nutritional Status and Mortality in the Critically Ill* [Internet]. 2015 [citado 13 de

- noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ingentaconnect.com/content/wk/ccm/2015/00000043/00000012/art00036>
112. García de Lorenzo A, Álvarez J, Calvo MV, de Ulíbarri JI, del Río J, Galbán C, et al. Conclusiones del II Foro de Debate SENPE sobre desnutrición hospitalaria. *Nutr Hosp* [Internet]. abril de 2005 [citado 11 de abril de 2018];20(2):82-7. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0212-16112005000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
113. Waitzberg DL, Ravacci GR, Raslan M. Desnutrición hospitalaria. *Nutr Hosp* [Internet]. abril de 2011 [citado 11 de abril de 2018];26(2):254-64. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0212-16112011000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
114. Bouillanne O, Golmard J-L, Coussieu C, Noël M, Durand D, Piette F, et al. Leptin a new biological marker for evaluating malnutrition in elderly patients. *Eur J Clin Nutr*. mayo de 2007;61(5):647-54.
115. Ravasco P, Anderson H, Mardones F. Métodos de valoración del estado nutricional. *Nutr Hosp* [Internet]. octubre de 2010 [citado 11 de abril de 2018];25:57-66. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0212-16112010000900009&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
116. Westergren A, Lindholm C, Axelsson C, Ulander K. Prevalence of eating difficulties and malnutrition among persons within hospital care and special accommodations. *J Nutr Health Aging*. enero de 2008;12(1):39-43.
117. Planas M, Audivert S, Pérez-Portabella C, Burgos R, Puiggrós C, Casanelles JM, et al. Nutritional status among adult patients admitted to an university-affiliated hospital in Spain at the time of genoma. *Clin Nutr Edinb Scotl*. octubre de 2004;23(5):1016-24.
118. Kruiuzenga HM, Wierdsma NJ, Van bokhorst MAE, De van der schueren, Hollander HJ, Jonkers-schuitema CF, et al. Screening of nutritional status in The Netherlands. *Clin Nutr* [Internet]. 1 de abril de 2003 [citado 13 de noviembre de 2019];22(2):147-52. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261561402906114>
119. Pirlich M, Schütz T, Norman K, Gastell S, Lübke HJ, Bischoff SC, et al. The German hospital malnutrition study. *Clin Nutr* [Internet]. 1 de agosto de 2006 [citado 13 de noviembre de 2019];25(4):563-72. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261561406000768>

120. Kondrup J, Johansen N, Plum LM, Bak L, Larsen IH, Martinsen A, et al. Incidence of nutritional risk and causes of inadequate nutritional care in hospitals. *Clin Nutr Edinb Scotl.* diciembre de 2002;21(6):461-8.
121. Rasmussen HH, Kondrup J, Staun M, Ladefoged K, Kristensen H, Wengler A. Prevalence of patients at nutritional risk in Danish hospitals. *Clin Nutr Edinb Scotl.* octubre de 2004;23(5):1009-15.
122. Acosta Escribano J, Gómez-Tello V, Ruiz Santana S. Valoración del estado nutricional en el paciente grave. *Nutr Hosp* [Internet]. junio de 2005 [citado 18 de abril de 2018];20:5-8. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0212-16112005000500002&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
123. Boles JM, Garre MA, Youinou PY, Mialon P, Menez JF, Jouquan J, et al. Nutritional status in intensive care patients: evaluation in 84 unselected patients. *Crit Care Med.* febrero de 1983;11(2):87-90.
124. M. Bueno, A. Sarría, J.M. Pérez-González. *Nutrición en pediatría (3ª Edición)* [Internet]. Editorial médica Ergon. [citado 16 de noviembre de 2019]. Disponible en: <http://ergon.es/producto/nutricion-en-pediatria/>
125. Keith N F. *Metabolic Regulation: A Human Perspective, 3rd Edition* [Internet]. 3.ª ed. Wiley-Blackwell; 2010 [citado 19 de abril de 2018]. 384 p. Disponible en: <https://www.wiley.com/en-us/Metabolic+Regulation%3A+A+Human+Perspective%2C+3rd+Edition-p-9781405183598>
126. Gottschlich M, Mattox T, DeLegge M. *The A.S.P.E.N. Nutrition Support Core Curriculum: A Case-Based Approach-The Adult Patient* [Internet]. 2.ª ed. Gottschlich MM ed; 2007 [citado 19 de abril de 2018]. 851 p. Disponible en: <http://ebookshelf.nutritioncare.org/AdCore1/>
127. Hise ME, Halterman K, Gajewski BJ, Parkhurst M, Moncure M, Brown JC. Feeding practices of severely ill intensive care unit patients: an evaluation of energy sources and clinical outcomes. *J Am Diet Assoc.* marzo de 2007;107(3):458-65.
128. Ortiz Leyba C, Gómez-Tello V, Serón Arbeloa C. [Requeriments of macronutrients and micronutrients]. *Nutr Hosp.* junio de 2005;20 Suppl 2:13-7.
129. McClave SA, Taylor BE, Martindale RG, Warren MM, Johnson DR, Braunschweig C, et al. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the

- Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* febrero de 2016;40(2):159-211.
130. Gunst J, Vanhorebeek I, Thiessen SE, Van den Berghe G. Amino acid supplements in critically ill patients. *Pharmacol Res.* abril de 2018;130:127-31.
131. Gunst J, Vanhorebeek I, Casaer MP, Hermans G, Wouters PJ, Dubois J, et al. Impact of early parenteral nutrition on metabolism and kidney injury. *J Am Soc Nephrol JASN.* mayo de 2013;24(6):995-1005.
132. Shaw JH, Wildbore M, Wolfe RR. Whole body protein kinetics in severely septic patients. The response to glucose infusion and total parenteral nutrition. *Ann Surg.* marzo de 1987;205(3):288-94.
133. Grimble RF. Immunonutrition. *Curr Opin Gastroenterol.* marzo de 2005;21(2):216-22.
134. Wischmeyer PE, Lynch J, Liedel J, Wolfson R, Riehm J, Gottlieb L, et al. Glutamine administration reduces Gram-negative bacteremia in severely burned patients: a prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control. *Crit Care Med.* noviembre de 2001;29(11):2075-80.
135. Newsholme P, Procopio J, Lima MMR, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct.* marzo de 2003;21(1):1-9.
136. Griffiths RD, Jones C, Allan Palmer TE. Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. *Nutrition [Internet].* 1 de abril de 1997 [citado 30 de agosto de 2018];13(4):295-302. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900797000178>
137. Novak F, Heyland DK, Avenell A, Drover JW, Su X. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med.* septiembre de 2002;30(9):2022-9.
138. Abilés J, Moreno-Torres R, Moratalla G, Castaño J, Pérez Abúd R, Mudarra A, et al. [Effects of supply with glutamine on antioxidant system and lipid peroxidation in patients with parenteral nutrition]. *Nutr Hosp.* agosto de 2008;23(4):332-9.

139. Heyland DK, Samis A. Does immunonutrition in patients with sepsis do more harm than good? *Intensive Care Med.* mayo de 2003;29(5):669-71.
140. Luiking YC, Poeze M, Ramsay G, Deutz NEP. The role of arginine in infection and sepsis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* febrero de 2005;29(1 Suppl):S70-74.
141. Heyland DK, Novak F, Drover JW, Jain M, Su X, Suchner U. Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA.* 22 de agosto de 2001;286(8):944-53.
142. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, et al. Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N Engl J Med.* 8 de noviembre de 2001;345(19):1359-67.
143. Hasselmann M, Reimund J-M. Lipids in the nutritional support of the critically ill patients. *Curr Opin Crit Care* [Internet]. diciembre de 2004 [citado 30 de agosto de 2018];10(6):449. Disponible en: https://journals.lww.com/co-criticalcare/Abstract/2004/12000/Lipids_in_the_nutritional_support_of_the.6.aspx
144. Roy CC, Bouthillier L, Seidman E, Levy E. New lipids in enteral feeding. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* marzo de 2004;7(2):117-22.
145. Mayer K, Gokorsch S, Fegbeutel C, Hattar K, Rosseau S, Walmrath D, et al. Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de mayo de 2003;167(10):1321-8.
146. Heller AR, Stehr SN, Litz RJ. Omega-3 alpha linolenic acid does not reflect the entire omega-3 fatty acid family. *Anesth Analg.* abril de 2006;102(4):1289; author reply 1289-1290.
147. Atkinson M, Worthley LIG. Nutrition in the critically ill patient: part II. Parenteral nutrition. *Crit Care Resusc J Australas Acad Crit Care Med.* junio de 2003;5(2):121-36.
148. Ayoglu H, Sezer U, Akin M, Okay D, Ayoglu F, Can M, et al. Selenium, copper, zinc, iron levels and mortality in patients with sepsis and systemic inflammatory response syndrome in Western Black Sea Region, Turkey. *JPMA J Pak Med Assoc.* abril de 2016;66(4):447-52.
149. Carver PL. Metal ions and infectious diseases. An overview from the clinic. *Met Ions Life Sci.* 2013;13:1-28.

150. Shanbhogue LK, Paterson N. Effect of sepsis and surgery on trace minerals. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* junio de 1990;14(3):287-9.
151. Khangarot BS, Rathore RS. Copper exposure reduced the resistance of the catfish *Saccobranhus fossilis* to *Aeromonas hydrophila* infection. *Bull Environ Contam Toxicol.* abril de 1999;62(4):490-5.
152. Corcoran TB, O'Neill MA, Webb S a. R, Ho KM. Prevalence of vitamin deficiencies on admission: relationship to hospital mortality in critically ill patients. *Anaesth Intensive Care.* marzo de 2009;37(2):254-60.
153. Dabar G, Harmouche C, Habr B, Riachi M, Jaber B. Shoshin Beriberi in Critically-Ill patients: case series. *Nutr J.* 17 de mayo de 2015;14:51.
154. Frank LL. Thiamin in Clinical Practice. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* julio de 2015;39(5):503-20.
155. Manzanares W, Hardy G. Thiamine supplementation in the critically ill. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* noviembre de 2011;14(6):610-7.
156. Donnino MW, Carney E, Cocchi MN, Barbash I, Chase M, Joyce N, et al. Thiamine deficiency in critically ill patients with sepsis. *J Crit Care.* diciembre de 2010;25(4):576-81.
157. Molina-López J, Florea D, Quintero-Osso B, de la Cruz AP, Rodríguez-Elvira M, Del Pozo EP. Pyridoxal-5'-phosphate deficiency is associated with hyperhomocysteinemia regardless of antioxidant, thiamine, riboflavin, cobalamine, and folate status in critically ill patients. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 2016;35(3):706-12.
158. Day GS, Ladak S, Curley K, Farb NAS, Masiowski P, Pringsheim T, et al. Thiamine prescribing practices within university-affiliated hospitals: a multicenter retrospective review. *J Hosp Med.* abril de 2015;10(4):246-53.
159. Cruickshank AM, Telfer AB, Shenkin A. Thiamine deficiency in the critically ill. *Intensive Care Med.* 1988;14(4):384-7.
160. Barbato M, Rodriguez PJ. Thiamine deficiency in patients admitted to a palliative care unit. *Palliat Med.* octubre de 1994;8(4):320-4.

161. Costa NA, Gut AL, de Souza Dorna M, Pimentel JAC, Cozzolino SMF, Azevedo PS, et al. Serum thiamine concentration and oxidative stress as predictors of mortality in patients with septic shock. *J Crit Care*. abril de 2014;29(2):249-52.
162. Berg KM, Gautam S, Saliccioli JD, Giberson T, Saindon B, Donnino MW. Intravenous thiamine is associated with increased oxygen consumption in critically ill patients with preserved cardiac index. *Ann Am Thorac Soc*. diciembre de 2014;11(10):1597-601.
163. Giacalone M, Martinelli R, Abramo A, Rubino A, Pavoni V, Iaconi P, et al. Rapid reversal of severe lactic acidosis after thiamine administration in critically ill adults: a report of 3 cases. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr*. febrero de 2015;30(1):104-10.
164. Quasim T, McMillan DC, Talwar D, Vasilaki A, St J O'Reilly D, Kinsella J. The relationship between plasma and red cell B-vitamin concentrations in critically-ill patients. *Clin Nutr Edinb Scotl*. diciembre de 2005;24(6):956-60.
165. Sriram K, Manzanares W, Joseph K. Thiamine in nutrition therapy. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr*. febrero de 2012;27(1):41-50.
166. Dounousi E, Zikou X, Koulouras V, Katopodis K. Metabolic acidosis during parenteral nutrition: Pathophysiological mechanisms. *Indian J Crit Care Med Peer-Rev Off Publ Indian Soc Crit Care Med*. mayo de 2015;19(5):270-4.
167. Andersen LW, Mackenhauer J, Roberts JC, Berg KM, Cocchi MN, Donnino MW. Etiology and therapeutic approach to elevated lactate levels. *Mayo Clin Proc*. octubre de 2013;88(10):1127-40.
168. Donnino MW, Andersen LW, Chase M, Berg KM, Tidswell M, Giberson T, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Thiamine as a Metabolic Resuscitator in Septic Shock: A Pilot Study. *Crit Care Med*. febrero de 2016;44(2):360-7.
169. Mallat J, Lemyze M, Thevenin D. Do not forget to give thiamine to your septic shock patient! *J Thorac Dis [Internet]*. junio de 2016 [citado 5 de septiembre de 2018];8(6):1062-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4885988/>
170. Collie JTB, Greaves RF, Jones OAH, Lam Q, Eastwood GM, Bellomo R. Vitamin B1 in critically ill patients: needs and challenges. *Clin Chem Lab Med*. 26 de octubre de 2017;55(11):1652-68.

171. Donnino MW, Vega J, Miller J, Walsh M. Myths and misconceptions of Wernicke's encephalopathy: what every emergency physician should know. *Ann Emerg Med.* diciembre de 2007;50(6):715-21.
172. Antony AC. Vegetarianism and vitamin B-12 (cobalamin) deficiency. *Am J Clin Nutr.* julio de 2003;78(1):3-6.
173. Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM, British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol.* agosto de 2014;166(4):496-513.
174. Romain M, Sviri S, Linton DM, Stav I, van Heerden PV. The role of Vitamin B12 in the critically ill--a review. *Anaesth Intensive Care.* julio de 2016;44(4):447-52.
175. Iftikhar H, Saleem M, Kaji A. Pernicious Anemia Presenting as Non-ST-elevated Myocardial Infarction and Depression. *Cureus.* 10 de junio de 2019;11(6):e4870.
176. Mohammadi M, Sadri E, Heydari B, Khalili H. Is a high serum vitamin B12 level associated with an increased mortality in critically ill surgical patients? *Anaesth Intensive Care.* enero de 2015;43(1):129-30.
177. Manzanares W, Hardy G. Vitamin B12: the forgotten micronutrient for critical care. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* noviembre de 2010;13(6):662-8.
178. Salles N, Herrmann F, Sakbani K, Rapin C-H, Sieber C. High vitamin B12 level: a strong predictor of mortality in elderly inpatients. *J Am Geriatr Soc.* mayo de 2005;53(5):917-8.
179. Corcoran TB, O'Neill MP, Webb S a. R, Ho KM. Inflammation, vitamin deficiencies and organ failure in critically ill patients. *Anaesth Intensive Care.* septiembre de 2009;37(5):740-7.
180. Scott JM, Weir DG. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk.* agosto de 1998;5(4):223-7.
181. Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: role of B vitamins on the one-carbon transfer pathways. *Chem Biol Interact.* 27 de octubre de 2006;163(1-2):113-32.
182. Fournier P, Fourcade J, Roncalli J, Salvayre R, Galinier M, Caussé E. Homocysteine in Chronic Heart Failure. *Clin Lab.* 2015;61(9):1137-45.

183. Peng H, Man C, Xu J, Fan Y. Elevated homocysteine levels and risk of cardiovascular and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective studies. *J Zhejiang Univ Sci B*. enero de 2015;16(1):78-86.
184. Boles JM, Garo BJ, Morin JF, Garre MA. Folic acid deficiency in intensive care patients: comparison between two regimens of supplementation. *Clin Nutr Edinb Scotl*. abril de 1989;8(2):69-73.
185. Erdem SS, Yerlikaya FH, Çiçekler H, Gül M. Association between ischemia-modified albumin, homocysteine, vitamin B(12) and folic acid in patients with severe sepsis. *Clin Chem Lab Med*. 14 de febrero de 2012;50(8):1417-21.
186. Tsantes A, Tsangaris I, Nikolopoulos G, Bagos P, Kopterides P, Antonakos G, et al. The effect of homocysteine on the clinical outcomes of ventilated patients with severe sepsis. *Minerva Anesthesiol*. octubre de 2010;76(10):787-94.
187. Campillo B, Zittoun J, de Gialluly E. Prophylaxis of folate deficiency in acutely ill patients: results of a randomized clinical trial. *Intensive Care Med*. 1988;14(6):640-5.
188. Oudemans-van Straaten HM, Spoelstra-de Man AM, de Waard MC. Vitamin C revisited. *Crit Care Lond Engl*. 6 de agosto de 2014;18(4):460.
189. Marik PE, Khangoora V, Rivera R, Hooper MH, Catravas J. Hydrocortisone, Vitamin C, and Thiamine for the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock: A Retrospective Before-After Study. *Chest*. 2017;151(6):1229-38.
190. Fowler AA, Syed AA, Knowlson S, Sculthorpe R, Farthing D, DeWilde C, et al. Phase I safety trial of intravenous ascorbic acid in patients with severe sepsis. *J Transl Med*. 31 de enero de 2014;12:32.
191. Zabet MH, Mohammadi M, Ramezani M, Khalili H. Effect of high-dose Ascorbic acid on vasopressor's requirement in septic shock. *J Res Pharm Pract*. junio de 2016;5(2):94-100.
192. Padayatty SJ, Levine M. Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis*. septiembre de 2016;22(6):463-93.
193. Carr AC, Shaw GM, Fowler AA, Natarajan R. Ascorbate-dependent vasopressor synthesis: a rationale for vitamin C administration in severe sepsis and septic shock? *Crit Care Lond Engl*. 27 de noviembre de 2015;19:418.

194. Mitchell AB, Ryan TE, Gillion AR, Wells LD, Muthiah MP. Vitamin C and Thiamine for Sepsis and Septic Shock. *Am J Med.* 27 de agosto de 2019;
195. Razzaque MS. Can adverse effects of excessive vitamin D supplementation occur without developing hypervitaminosis D? *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 1 de junio de 2018 [citado 22 de julio de 2019];180:81-6. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076017301711>
196. Razzaque MS. Sunlight exposure: Do health benefits outweigh harm? *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 1 de enero de 2018 [citado 22 de julio de 2019];175:44-8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076016302400>
197. Razzaque MS. The dualistic role of vitamin D in vascular calcifications. *Kidney Int* [Internet]. abril de 2011 [citado 22 de julio de 2019];79(7):708-14. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3120050/>
198. Chen Z, Luo Z, Zhao X, Chen Q, Hu J, Qin H, et al. Association of vitamin D status of septic patients in intensive care units with altered procalcitonin levels and mortality. *J Clin Endocrinol Metab.* febrero de 2015;100(2):516-23.
199. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 19 de julio de 2007;357(3):266-81.
200. Putzu A, Belletti A, Cassina T, Clivio S, Monti G, Zangrillo A, et al. Vitamin D and outcomes in adult critically ill patients. A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Crit Care.* 2017;38:109-14.
201. Lasky-Su J, Dahlin A, Litonjua AA, Rogers AJ, McGeachie MJ, Baron RM, et al. Metabolome alterations in severe critical illness and vitamin D status. *Crit Care Lond Engl.* 28 de 2017;21(1):193.
202. Dizdar OS, Baspınar O, Kocer D, Dursun ZB, Avcı D, Karakükcü C, et al. Nutritional Risk, Micronutrient Status and Clinical Outcomes: A Prospective Observational Study in an Infectious Disease Clinic. *Nutrients.* 29 de febrero de 2016;8(3):124.
203. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* diciembre de 1995;41(12 Pt 2):1819-28.
204. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* diciembre de 2002;30(6):620-50.

205. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* agosto de 1994;52(8 Pt 1):253-65.
206. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161-208.
207. Holben DH, Smith AM. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc.* julio de 1999;99(7):836-43.
208. Gutteridge JM, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull.* 1999;55(1):49-75.
209. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 1 de enero de 2009;417(1):1-13.
210. Chen Y-R, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res.* 31 de enero de 2014;114(3):524-37.
211. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* junio de 2014;15(6):411-21.
212. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* 26 de octubre de 2012;48(2):158-67.
213. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal.* diciembre de 2007;9(12):2277-93.
214. Townsend DM, Manevich Y, He L, Xiong Y, Bowers RR, Hutchens S, et al. Nitrosative stress-induced s-glutathionylation of protein disulfide isomerase leads to activation of the unfolded protein response. *Cancer Res.* 1 de octubre de 2009;69(19):7626-34.
215. Csordás G, Hajnóczky G. SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS. *Biochim Biophys Acta.* noviembre de 2009;1787(11):1352-62.
216. Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1987;25(4):317-64.
217. Bontemps F, Van den Berghe G, Hers HG. Pathways of adenine nucleotide catabolism in erythrocytes. *J Clin Invest.* marzo de 1986;77(3):824-30.

218. Martínez Sánchez G. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cuba Farm* [Internet]. diciembre de 2005 [citado 16 de octubre de 2019];39(3):0-0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-75152005000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
219. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 9 de enero de 2003;348(2):138-50.
220. Cepinskas G, Wilson JX. Inflammatory response in microvascular endothelium in sepsis: role of oxidants. *J Clin Biochem Nutr*. mayo de 2008;42(3):175-84.
221. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth*. febrero de 2003;90(2):221-32.
222. Rawat R, Humphrey JH, Mutasa K, Ntozini R, Stoltzfus RJ. Short communication: predicting adverse HIV-related outcomes in a resource-limited setting: use of the inflammation marker $\alpha(1)$ -acid glycoprotein. *AIDS Res Hum Retroviruses*. noviembre de 2010;26(11):1171-4.
223. Oda S, Hirasawa H, Shiga H, Nakanishi K, Matsuda K, Nakamura M. Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine* [Internet]. 21 de febrero de 2005 [citado 9 de septiembre de 2019];29(4):169-75. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466604003151>
224. Li H, Liu W, Xie J. Circulating interleukin-6 levels and cardiovascular and all-cause mortality in the elderly population: A meta-analysis. *Arch Gerontol Geriatr* [Internet]. 1 de noviembre de 2017 [citado 2 de julio de 2019];73:257-62. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167494317302728>
225. Steinmetz HT, Herbertz A, Bertram M, Diehl V. Increase in interleukin-6 serum level preceding fever in granulocytopenia and correlation with death from sepsis. *J Infect Dis*. enero de 1995;171(1):225-8.
226. Hack CE, Groot ED, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Schijndel RSV, Eerenberg-Belmer AJ, et al. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis [see comments]. *Blood* [Internet]. 1 de octubre de 1989 [citado 2 de julio de 2019];74(5):1704-10. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/content/74/5/1704>

227. Hummel M, Czerlinski S, Friedel N, Liebenthal C, Hasper D, von Baehr R, et al. Interleukin-6 and interleukin-8 concentrations as predictors of outcome in ventricular assist device patients before heart transplantation. *Crit Care Med.* marzo de 1994;22(3):448-54.
228. Buck C, Bundschu J, Bartmann P, Pohlandt F, Gallati H. Interleukin-6: A Sensitive Parameter for the Early Diagnosis of Neonatal Bacterial Infection. *Pediatrics* [Internet]. 1 de enero de 1994 [citado 2 de julio de 2019];93(1):54-8. Disponible en: <https://pediatrics.aappublications.org/content/93/1/54>
229. Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Müller-Newen G, Grötzinger J, Rose-John S, et al. Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 1 de junio de 2012 [citado 2 de julio de 2019];23(3):85-97. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610112000160>
230. Lelli JL, Becks LL, Dabrowska MI, Hinshaw DB. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* octubre de 1998;25(6):694-702.
231. Lee YJ, Shacter E. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J Biol Chem.* 9 de julio de 1999;274(28):19792-8.
232. Bavunoglu I, Genc H, Konukoglu D, Cicekci H, Sozer V, Gelisgen R, et al. Oxidative stress parameters and inflammatory and immune mediators as markers of the severity of sepsis. *J Infect Dev Ctries.* 31 de octubre de 2016;10(10):1045-52.
233. Bateman RM, Sharpe MD, Singer M, Ellis CG. The Effect of Sepsis on the Erythrocyte. *Int J Mol Sci* [Internet]. 8 de septiembre de 2017 [citado 9 de mayo de 2018];18(9):1932. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/9/1932>
234. Pinto BB, Dyson A, Umbrello M, Carré JE, Ritter C, Clatworthy I, et al. Improved Survival in a Long-Term Rat Model of Sepsis Is Associated With Reduced Mitochondrial Calcium Uptake Despite Increased Energetic Demand. *Crit Care Med.* agosto de 2017;45(8):e840-8.
235. Bateman RM, Sharpe MD, Jagger JE, Ellis CG. Sepsis impairs microvascular autoregulation and delays capillary response within hypoxic capillaries. *Crit Care Lond Engl.* 5 de noviembre de 2015;19:389.

236. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Brohee D, Piro P, Carlier E, Vincent J-L, et al. Alterations of red blood cell shape and sialic acid membrane content in septic patients. *Crit Care Med.* agosto de 2003;31(8):2156-62.
237. Fontana V, Spadaro S, Bond O, Cavicchi FZ, Annoni F, Donadello K, et al. No relationship between red blood cell distribution width and microcirculatory alterations in septic patients. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2017;66(2):131-41.
238. Langenfeld JE, Machiedo GW, Lyons M, Rush BF, Dikdan G, Lysz TW. Correlation between red blood cell deformability and changes in hemodynamic function. *Surgery.* noviembre de 1994;116(5):859-67.
239. Ibrahim E el din S, McLellan SA, Walsh TS. Red blood cell 2,3-diphosphoglycerate concentration and in vivo P50 during early critical illness. *Crit Care Med.* octubre de 2005;33(10):2247-52.
240. Morgan TJ, Koch D, Morris D, Clague A, Purdie DM. Reduced red cell 2,3-diphosphoglycerate concentrations in critical illness without decreased in vivo P50. *Anaesth Intensive Care.* octubre de 2001;29(5):479-83.
241. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med.* abril de 1995;23(4):646-51.
242. Cowley HC, Bacon PJ, Goode HF, Webster NR, Jones JG, Menon DK. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit Care Med.* julio de 1996;24(7):1179-83.
243. Doise J-M, Aho LS, Quenot J-P, Guillard J-C, Zeller M, Vergely C, et al. Plasma antioxidant status in septic critically ill patients: a decrease over time. *Fundam Clin Pharmacol.* abril de 2008;22(2):203-9.
244. Alvarez JA, Grunwell JR, Gillespie SE, Tangpricha V, Hebbar KB. Vitamin D deficiency is associated with an oxidized plasma cysteine redox potential in critically ill children. *J Steroid Biochem Mol Biol.* enero de 2018;175:164-9.
245. Mahmud H, Qadri SM, Föller M, Lang F. Inhibition of suicidal erythrocyte death by vitamin C. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* junio de 2010;26(6):671-6.

246. Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF, Dikdan G. Effect of alpha-tocopherol on red cell deformability and survival in sepsis. *Curr Surg.* octubre de 1989;46(5):380-2.
247. Rattan V, Hans CP, Cruz SD, Pathak R, Rao P, Mehta S. Assessment of oxidative stress and antioxidant status in patients of acute renal failure with sepsis. *World J Pharm Res.* 14 de abril de 2015;4:1457-1464.
248. Metnitz PG, Bartens C, Fischer M, Fridrich P, Steltzer H, Druml W. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* febrero de 1999;25(2):180-5.
249. Pascual C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Oberhoffer M, Horn A, Bredle D, et al. Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. *Crit Care Med.* abril de 1998;26(4):705-9.
250. Dewas C, Dang PM-C, Gougerot-Pocidallo M-A, El-Benna J. TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 de octubre de 2003;171(8):4392-8.
251. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* julio de 2000;109(1):33-44.
252. Oliveira YPA de, Pontes-de-Carvalho LC, Couto RD, Noronha-Dutra AA. Oxidative stress in sepsis. Possible production of free radicals through an erythrocyte-mediated positive feedback mechanism. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis.* febrero de 2017;21(1):19-26.
253. Luchtemberg MN, Petronilho F, Constantino L, Gelain DP, Andrades M, Ritter C, et al. Xanthine oxidase activity in patients with sepsis. *Clin Biochem.* octubre de 2008;41(14-15):1186-90.
254. Karapetsa M, Pitsika M, Goutzourelas N, Stagos D, Tousia Becker A, Zakyntinos E. Oxidative status in ICU patients with septic shock. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* noviembre de 2013;61:106-11.
255. Guerreiro MO, Petronilho F, Andrades M, Constantino L, Mina FG, Moreira JCF, et al. Plasma superoxide dismutase activity and mortality in septic patients [corrected]. *J Trauma.* diciembre de 2010;69(6):E102-106.

256. Warner A, Bencosme A, Healy D, Verme C. Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment. *Clin Chem.* junio de 1995;41(6 Pt 1):867-71.
257. Bogdanova A, Makhro A, Wang J, Lipp P, Kaestner L. Calcium in red blood cells-a perilous balance. *Int J Mol Sci.* 8 de mayo de 2013;14(5):9848-72.
258. Desai TK, Carlson RW, Geheb MA. Prevalence and clinical implications of hypocalcemia in acutely ill patients in a medical intensive care setting. *Am J Med.* febrero de 1988;84(2):209-14.
259. Todd JC, Mollitt DL. Effect of sepsis on erythrocyte intracellular calcium homeostasis. *Crit Care Med.* marzo de 1995;23(3):459-65.
260. Ruef P, Ehrhard M, Frommhold D, Koch L, Fritzsching B, Poeschl J. Lipid A decreases human erythrocytes deformability by increasing intracellular Ca(2+): effects of verapamil, staurosporine and the rho-kinase inhibitor Y-27632. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2011;49(1-4):315-22.
261. Lau YT, Hsieh CC, Liu MS, Hwang TL, Chen MF, Cheng HS. Erythrocyte Ca²⁺ pump is defective during sepsis. *Circ Shock.* noviembre de 1994;44(3):121-5.
262. Dare AJ, Phillips ARJ, Hickey AJR, Mittal A, Loveday B, Thompson N, et al. A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Free Radic Biol Med.* 1 de diciembre de 2009;47(11):1517-25.
263. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet Lond Engl.* 20 de julio de 2002;360(9328):219-23.
264. Fredriksson K, Hammarqvist F, Strigård K, Hulténby K, Ljungqvist O, Wernerman J, et al. Derangements in mitochondrial metabolism in intercostal and leg muscle of critically ill patients with sepsis-induced multiple organ failure. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* noviembre de 2006;291(5):E1044-1050.
265. Andrades ME, Ritter C, Dal-Pizzol F. The role of free radicals in sepsis development. *Front Biosci Elite Ed.* 1 de junio de 2009;1:277-87.
266. Suetrong B, Walley KR. Lactic Acidosis in Sepsis: It's Not All Anaerobic: Implications for Diagnosis and Management. *Chest.* enero de 2016;149(1):252-61.

267. Levy B, Gibot S, Franck P, Cravoisy A, Bollaert P-E. Relation between muscle Na⁺K⁺ ATPase activity and raised lactate concentrations in septic shock: a prospective study. *Lancet Lond Engl.* 5 de marzo de 2005;365(9462):871-5.
268. Vary TC, Siegel JH. Effect of sepsis on activity of pyruvate dehydrogenase complex in skeletal muscle and liver. *Am J Physiol.* marzo de 1989;256(3 Pt 1):E445.
269. Levraut J, Ciebiera JP, Chave S, Rabary O, Jambou P, Carles M, et al. Mild hyperlactatemia in stable septic patients is due to impaired lactate clearance rather than overproduction. *Am J Respir Crit Care Med.* abril de 1998;157(4 Pt 1):1021-6.
270. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:711-60.
271. Vulcano D, Andrea L, Soraci AL, Tapia MO. Homeostasis del glutati3n. *Acta Bioqu3mica Cl3nica Latinoam* [Internet]. septiembre de 2013 [citado 8 de agosto de 2018];47(3):0-0. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0325-29572013000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
272. Diaz Vivancos P, Wolff T, Markovic J, Pallard3 FV, Foyer CH. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem J.* 15 de octubre de 2010;431(2):169-78.
273. Orłowski M, Meister A. The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* noviembre de 1970;67(3):1248-55.
274. Inoue M. Glutathionists in the battlefield of gamma-glutamyl cycle. *Arch Biochem Biophys.* 1 de abril de 2016;595:61-3.
275. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* junio de 2003;57(3-4):145-55.
276. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul.* 2000;36:95-116.
277. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 1 de julio de 2003;333(1):19-39.
278. Camera E, Picardo M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 5 de diciembre de 2002;781(1-2):181-206.

-
279. Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1985;25:715-44.
280. Meister A. On the discovery of glutathione. *Trends Biochem Sci.* mayo de 1988;13(5):185-8.
281. Seelig GF, Meister A. Glutathione biosynthesis; gamma-glutamylcysteine synthetase from rat kidney. *Methods Enzymol.* 1985;113:379-90.
282. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* julio de 1999;13(10):1169-83.
283. Mills GC. The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J Biol Chem.* marzo de 1959;234(3):502-6.
284. Morris D, Khurasany M, Nguyen T, Kim J, Guilford F, Mehta R, et al. Glutathione and infection. *Biochim Biophys Acta.* mayo de 2013;1830(5):3329-49.
285. Kim JS, Kwon WY, Suh GJ, Kim KS, Jung YS, Kim SH, et al. Plasma glutathione reductase activity and prognosis of septic shock. *J Surg Res.* enero de 2016;200(1):298-307.
286. Richards NGJ, Kilberg MS. Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:629-54.
287. Le A, Lane AN, Hamaker M, Bose S, Gouw A, Barbi J, et al. Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab.* 4 de enero de 2012;15(1):110-21.
288. El Hage M, Conjard-Duplany A, Baverel G, Martin G. Metabolic fate of a high concentration of glutamine and glutamate in rat brain slices: a ¹³C NMR study. *Neurochem Int.* julio de 2011;58(8):896-903.
289. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 de mayo de 2010;107(19):8788-93.
290. Whillier S, Garcia B, Chapman BE, Kuchel PW, Raftos JE. Glutamine and α -ketoglutarate as glutamate sources for glutathione synthesis in human erythrocytes. *FEBS J.* septiembre de 2011;278(17):3152-63.

291. Huang W, Choi W, Chen Y, Zhang Q, Deng H, He W, et al. A proposed role for glutamine in cancer cell growth through acid resistance. *Cell Res.* mayo de 2013;23(5):724-7.
292. Kumar M, Chatterjee A, Khedkar AP, Kusumanchi M, Adhikary L. Mass spectrometric distinction of in-source and in-solution pyroglutamate and succinimide in proteins: a case study on rhG-CSF. *J Am Soc Mass Spectrom.* febrero de 2013;24(2):202-12.
293. Eckstein JA, Ammerman GM, Reveles JM, Ackermann BL. Analysis of glutamine, glutamate, pyroglutamate, and GABA in cerebrospinal fluid using ion pairing HPLC with positive electrospray LC/MS/MS. *J Neurosci Methods.* 30 de junio de 2008;171(2):190-6.
294. Purwaha P, Silva LP, Hawke DH, Weinstein JN, Lorenzi PL. An artifact in LC-MS/MS measurement of glutamine and glutamic acid: in-source cyclization to pyroglutamic acid. *Anal Chem.* 17 de junio de 2014;86(12):5633-7.
295. Nagana Gowda GA, Gowda YN, Raftery D. Massive glutamine cyclization to pyroglutamic acid in human serum discovered using NMR spectroscopy. *Anal Chem.* 7 de abril de 2015;87(7):3800-5.
296. Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 15 de julio de 2000;60(14):3927-39.
297. Antunes F, Han D, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med.* 1 de noviembre de 2002;33(9):1260-7.
298. Creer MH, Lau BW, Jones JD, Chan KM. Pyroglutamic acidemia in an adult patient. *Clin Chem.* abril de 1989;35(4):684-6.
299. Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, Ming-Yu Y, Lu XM, Zurakowski D, Curley M, et al. Cysteine metabolism and whole blood glutathione synthesis in septic pediatric patients. *Crit Care Med.* abril de 2001;29(4):870-7.
300. Németh I, Boda D. Xanthine oxidase activity and blood glutathione redox ratio in infants and children with septic shock syndrome. *Intensive Care Med.* enero de 2001;27(1):216-21.

301. Jackson AA, Gibson NR, Lu Y, Jahoor F. Synthesis of erythrocyte glutathione in healthy adults consuming the safe amount of dietary protein. *Am J Clin Nutr.* julio de 2004;80(1):101-7.
302. Lord RS, Bralley JA. Clinical applications of urinary organic acids. Part I: Detoxification markers. *Altern Med Rev J Clin Ther.* septiembre de 2008;13(3):205-15.
303. Geenen S, Yates JWT, Kenna JG, Bois FY, Wilson ID, Westerhoff HV. Multiscale modelling approach combining a kinetic model of glutathione metabolism with PBPK models of paracetamol and the potential glutathione-depletion biomarkers ophthalmic acid and 5-oxoproline in humans and rats. *Integr Biol Quant Biosci Nano Macro.* junio de 2013;5(6):877-88.
304. Yu Y-M, Ryan CM, Fei Z-W, Lu X-M, Castillo L, Schultz JT, et al. Plasma L-5-oxoproline kinetics and whole blood glutathione synthesis rates in severely burned adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* febrero de 2002;282(2):E247-258.
305. Lord RS. Long-term patterns of urinary pyroglutamic acid in healthy humans. *Physiol Rep [Internet].* 23 de febrero de 2016 [citado 13 de agosto de 2018];4(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4816898/>
306. Metges CC, Yu YM, Cai W, Lu XM, Wong S, Regan MM, et al. Oxoproline kinetics and oxoproline urinary excretion during glycine- or sulfur amino acid-free diets in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* mayo de 2000;278(5):E868-876.
307. Yeligar SM, Harris FL, Hart CM, Brown LAS. Glutathione attenuates ethanol-induced alveolar macrophage oxidative stress and dysfunction by downregulating NADPH oxidases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1 de marzo de 2014;306(5):L429-441.
308. Sekhar RV, Patel SG, Guthikonda AP, Reid M, Balasubramanyam A, Taffet GE, et al. Deficient synthesis of glutathione underlies oxidative stress in aging and can be corrected by dietary cysteine and glycine supplementation. *Am J Clin Nutr.* septiembre de 2011;94(3):847-53.
309. Paterson RL, Galley HF, Webster NR. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit Care Med.* noviembre de 2003;31(11):2574-8.
310. Homma T, Fujii J. Application of Glutathione as Anti-Oxidative and Anti-Aging Drugs. *Curr Drug Metab.* 2015;16(7):560-71.

311. Bueno Y, Muñoz G, Torres Sáez R. Implementación de técnicas sencillas de remoción de proteínas mayoritarias de plasma sanguíneo para análisis por electroforesis bidimensional(2D). *Rev Colomb Quím* [Internet]. 2011 [citado 17 de septiembre de 2018];40(2). Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=309026687001>
312. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. julio de 1967;70(1):158-69.
313. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 23 de agosto de 1976;71(4):952-8.
314. Naime ACA, Ganaes JOF, Lopes-Pires ME. Sepsis: The Involvement of Platelets and the Current Treatments. *Curr Mol Pharmacol*. 2018;11(4):261-9.
315. Sachse C, Machens HG, Felmerer G, Berger A, Henkel E. Procalcitonin as a Marker for the Early Diagnosis of Severe Infection After Thermal Injury. *J Burn Care Rehabil* [Internet]. 1 de septiembre de 1999 [citado 1 de noviembre de 2019];20(5):354-60. Disponible en: <https://academic.oup.com/jbcr/article/20/5/354/4758066>
316. Magrini L, Travaglino F, Marino R, Ferri E, De Berardinis B, Cardelli P, et al. Procalcitonin variations after Emergency Department admission are highly predictive of hospital mortality in patients with acute infectious diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. febrero de 2013;17 Suppl 1:133-42.
317. Poeze M, Luiking YC, Breedveld P, Manders S, Deutz NEP. Decreased plasma glutamate in early phases of septic shock with acute liver dysfunction is an independent predictor of survival. *Clin Nutr Edinb Scotl*. agosto de 2008;27(4):523-30.
318. Šudomová M, Hassan STS, Khan H, Rasekhian M, Nabavi SM. A Multi-Biochemical and In Silico Study on Anti-Enzymatic Actions of Pyroglutamic Acid against PDE-5, ACE, and Urease Using Various Analytical Techniques: Unexplored Pharmacological Properties and Cytotoxicity Evaluation. *Biomolecules*. 21 de agosto de 2019;9(9).
319. Kumar A, Bachhawat AK. A futile cycle, formed between two ATP-dependant gamma-glutamyl cycle enzymes, gamma-glutamyl cysteine synthetase and 5-oxoprolinase: the cause of cellular ATP depletion in nephrotic cystinosis? *J Biosci*. marzo de 2010;35(1):21-5.

-
320. Ristoff E, Larsson A. Inborn errors in the metabolism of glutathione. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 30 de marzo de 2007 [citado 26 de junio de 2018];2:16. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-16>
321. Mogensen KM, Lasky-Su J, Rogers AJ, Baron RM, Fredenburgh LE, Rawn J, et al. Metabolites Associated With Malnutrition in the Intensive Care Unit Are Also Associated With 28-Day Mortality. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2017;41(2):188-97.
322. Asci A, Surmeli-Onay O, Erkekoglu P, Yigit S, Yurdakok M, Kocer-Gumusel B. Oxidant and antioxidant status in neonatal proven and clinical sepsis according to selenium status. *Pediatr Int Off J Jpn Pediatr Soc*. diciembre de 2015;57(6):1131-7.
323. Forceville X, Mostert V, Pierantoni A, Vitoux D, Le Toumelin P, Plouvier E, et al. Selenoprotein P, rather than glutathione peroxidase, as a potential marker of septic shock and related syndromes. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur*. 2009;43(4):338-47.
324. Forceville X, Vitoux D, Gauzit R, Combes A, Lahilaire P, Chappuis P. Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients. *Crit Care Med*. septiembre de 1998;26(9):1536-44.
325. Jang JY, Lee SH, Shim H, Lee JG. Serum oxygen radical activity and total antioxidation capacity are related with severities of surgical patient with sepsis: Prospective pilot study. *J Crit Care*. 2017;39:131-6.
326. Ashton K, Hooper L, Harvey LJ, Hurst R, Casgrain A, Fairweather-Tait SJ. Methods of assessment of selenium status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. junio de 2009;89(6):2025S-2039S.
327. Stefanowicz FA, Talwar D, O'Reilly DSJ, Dickinson N, Atkinson J, Hursthouse AS, et al. Erythrocyte selenium concentration as a marker of selenium status. *Clin Nutr Edinb Scotl*. octubre de 2013;32(5):837-42.
328. Forceville X. Effects of high doses of selenium, as sodium selenite, in septic shock patients a placebo-controlled, randomized, double-blind, multi-center phase II study--selenium and sepsis. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS*. 2007;21 Suppl 1:62-5.
329. Millán Adame E, Florea D, Sáez Pérez L, Molina López J, López-González B, Pérez de la Cruz A, et al. Deficient selenium status of a healthy adult Spanish population. *Nutr Hosp*. abril de 2012;27(2):524-8.

330. Levander OA. Selenium requirements as discussed in the 1996 joint FAO/IAEA/WHO expert consultation on trace elements in human nutrition. *Biomed Environ Sci BES*. septiembre de 1997;10(2-3):214-9.
331. Costa NA, Gut AL, Pimentel JAC, Cozzolino SMF, Azevedo PS, Fernandes AAH, et al. Erythrocyte selenium concentration predicts intensive care unit and hospital mortality in patients with septic shock: a prospective observational study. *Crit Care Lond Engl*. 7 de mayo de 2014;18(3):R92.
332. Manzanares W, Lemieux M, Elke G, Langlois PL, Bloos F, Heyland DK. High-dose intravenous selenium does not improve clinical outcomes in the critically ill: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Lond Engl*. 28 de octubre de 2016;20(1):356.
333. Heyland DK. Selenium supplementation in critically ill patients: can too much of a good thing be a bad thing? *Crit Care Lond Engl*. 2007;11(4):153.
334. Köhrle J. Selenium and the thyroid. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. octubre de 2015;22(5):392-401.
335. Hulley SL, Perring J, Manning N, Olpin S, Yap S. Transient 5-oxoprolinuria: unusually high anion gap acidosis in an infant. *Eur J Pediatr*. diciembre de 2015;174(12):1685-8.
336. Luyasu S, Wamelink MMC, Galanti L, Dive A. Pyroglutamic acid-induced metabolic acidosis: a case report. *Acta Clin Belg*. junio de 2014;69(3):221-3.
337. Humphreys BD, Forman JP, Zandi-Nejad K, Bazari H, Seifter J, Magee CC. Acetaminophen-induced anion gap metabolic acidosis and 5-oxoprolinuria (pyroglutamic aciduria) acquired in hospital. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. julio de 2005;46(1):143-6.
338. Dempsey GA, Lyall HJ, Corke CF, Scheinkestel CD. Pyroglutamic acidemia: a cause of high anion gap metabolic acidosis. *Crit Care Med*. junio de 2000;28(6):1803-7.
339. Zand L, Muriithi A, Nelsen E, Franco PM, Greene EL, Qian Q, et al. Severe anion gap metabolic acidosis from acetaminophen use secondary to 5-oxoproline (pyroglutamic acid) accumulation. *Am J Med Sci*. diciembre de 2012;344(6):501-4.
340. Weiler S, Bellmann R, Kullak-Ublick GA. [5-Oxoproline (pyroglutamic acid) acidosis and acetaminophen- a differential diagnosis in high anion gap metabolic acidosis]. *Ther Umsch Rev Ther*. diciembre de 2015;72(11-12):737-41.

-
341. Abkur TM, Mohammed W, Ali M, Casserly L. Acetaminophen-induced anion gap metabolic acidosis secondary to 5-oxoproline: a case report. *J Med Case Reports*. 6 de diciembre de 2014;8:409.
342. Lanoy C, Bouckaert Y. Metabolic acidosis and 5-oxoprolinuria induced by flucloxacillin and acetaminophen: a case report. *J Med Case Reports*. 23 de junio de 2016;10(1):184.
343. Lawrence DT, Bechtel LK, Charlton NP, Holstege CP. 5-oxoproline-induced anion gap metabolic acidosis after an acute acetaminophen overdose. *J Am Osteopath Assoc*. septiembre de 2010;110(9):545-51.
344. O'Brien LMN, Hooper M, Flemmer M, Marik PE. Chronic acetaminophen ingestion resulting in severe anion gap metabolic acidosis secondary to 5-oxoproline accumulation: an under diagnosed phenomenon. *BMJ Case Rep [Internet]*. 27 de julio de 2012 [citado 25 de noviembre de 2018];2012. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3391392/>
345. Hitzing S, Böttcher A, Laube M. [Metabolic Acidosis under Acetaminophen Intake - an Unordinary Side Effect]. *Anesthesiologie Intensivmed Notfallmedizin Schmerzther AINS*. octubre de 2018;53(10):718-22.
346. Schwahn B, Kameda G, Wessalowski R, Mayatepek E. Severe hyperhomocysteinaemia and 5-oxoprolinuria secondary to antiproliferative and antimicrobial drug treatment. *J Inher Metab Dis*. 2005;28(1):99-102.
347. Heireman L, Mahieu B, Helbert M, Uyttenbroeck W, Stroobants J, Piqueur M. High anion gap metabolic acidosis induced by cumulation of ketones, L- and D-lactate, 5-oxoproline and acute renal failure. *Acta Clin Belg*. agosto de 2018;73(4):313-6.
348. Spector SR, Mayan H, Loebstein R, Markovits N, Priel E, Massalha E, et al. Pyroglutamic acidosis as a cause for high anion gap metabolic acidosis: a prospective study. *Sci Rep*. 5 de marzo de 2019;9(1):3554.
349. Pascual C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Oberhoffer M, Horn A, Bredle D, et al. Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. *Crit Care Med*. abril de 1998;26(4):705-9.
350. Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, Abreu-González P, López RO, Ferreres J, et al. Serum total antioxidant capacity during the first week of sepsis and mortality. *J Crit Care*

[Internet]. 1 de octubre de 2018 [citado 3 de noviembre de 2019];47:139-44. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088394411830515X>

351. Chuang C-C, Shiesh S-C, Chi C-H, Tu Y-F, Hor L-I, Shieh C-C, et al. Serum total antioxidant capacity reflects severity of illness in patients with severe sepsis. *Crit Care Lond Engl*. febrero de 2006;10(1):R36.
352. MacKinnon KL, Molnar Z, Lowe D, Watson ID, Shearer E. Measures of total free radical activity in critically ill patients. *Clin Biochem*. junio de 1999;32(4):263-8.
353. Lorente L, Martín MM, Almeida T, Abreu-González P, Ferreres J, Solé-Violán J, et al. Association between serum total antioxidant capacity and mortality in severe septic patients. *J Crit Care*. febrero de 2015;30(1):217.e7-12.
354. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-acetylcysteine - a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. agosto de 2007 [citado 2 de noviembre de 2019];7(4):355-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4540061/>
355. Mokhtari V, Afsharian P, Shahhoseini M, Kalantar SM, Moini A. A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine. *Cell J*. junio de 2017;19(1):11-7.
356. Csontos C, Rezman B, Foldi V, Bogar L, Drenkovics L, Röth E, et al. Effect of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress and inflammation after severe burn. *Burns J Int Soc Burn Inj*. mayo de 2012;38(3):428-37.
357. Fraga CM, Tomasi CD, Biff D, Topanotti MFL, Felisberto F, Vuolo F, et al. The effects of N-acetylcysteine and deferoxamine on plasma cytokine and oxidative damage parameters in critically ill patients with prolonged hypotension: a randomized controlled trial. *J Clin Pharmacol*. septiembre de 2012;52(9):1365-72.
358. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci CMLS*. enero de 2003;60(1):6-20.
359. Steckert AV, de Castro AA, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Sepsis in the central nervous system and antioxidant strategies with N-acetylcysteine, vitamins and statins. *Curr Neurovasc Res*. febrero de 2014;11(1):83-90.

-
360. Toklu HZ, Tunali Akbay T, Velioglu-Ogunc A, Ercan F, Gedik N, Keyer-Uysal M, et al. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, prevents sepsis-induced acute lung and brain injury. *J Surg Res.* abril de 2008;145(2):214-22.
361. Ellouze O, Frikha N, Ouerghi S, Mestiri T, Salah Ben Ammar M. [N-acetylcysteine in septic shock]. *Tunis Med.* octubre de 2011;89(10):738-44.
362. Winiarska K, Drozak J. [Glutathione in therapy]. *Postepy Hig Med Dosw.* 2002;56(4):521-36.
363. Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology* Baltim Md. enero de 2010;51(1):246-54.
364. Tanaka KAK, Kurihara S, Shibakusa T, Chiba Y, Mikami T. Cystine improves survival rates in a LPS-induced sepsis mouse model. *Clin Nutr Edinb Scotl.* diciembre de 2015;34(6):1159-65.
365. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 1 de octubre de 2011 [citado 21 de junio de 2018];15(7):1957-97. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3159114/>
366. Peivandi Yazdi A, Razavi M, Sheikh S, Boroumand N, Salehi M, Hashemy SI. Clinical Trial Assessment of Intermittent and Continuous Infusion Dose of N-Acetylcysteine on Redox Status of the Body in Patients with Sepsis Admitted to the ICU. *J Intensive Care Med.* 13 de enero de 2019;885066618823152.
367. Chertoff J. N-Acetylcysteine's Role in Sepsis and Potential Benefit in Patients With Microcirculatory Derangements. *J Intensive Care Med.* febrero de 2018;33(2):87-96.
368. Mullins ME, Jones MS, Nerenz RD, Schwarz ES, Dietzen DJ. 5-Oxoproline concentrations in acute acetaminophen overdose. *Clin Toxicol Phila Pa.* 3 de mayo de 2019;1-3.
369. Rinaldi S, Landucci F, De Gaudio AR. Antioxidant therapy in critically septic patients. *Curr Drug Targets.* septiembre de 2009;10(9):872-80.
370. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth.* julio de 2011;107(1):57-64.

371. Heyland D, Muscedere J, Wischmeyer PE, Cook D, Jones G, Albert M, et al. A randomized trial of glutamine and antioxidants in critically ill patients. *N Engl J Med*. 18 de abril de 2013;368(16):1489-97.
372. Yang Y, Li L, Hang Q, Fang Y, Dong X, Cao P, et al. γ -glutamylcysteine exhibits anti-inflammatory effects by increasing cellular glutathione level. *Redox Biol*. 2019;20:157-66.
373. Coelho Neto A, Azevedo RP, Santos MBP, Galdieri L de C, D'Almeida V, Amaral JLG do, et al. Homocysteine plasma levels as a marker of clinical severity in septic patients. *Rev Bras Ter Intensiva*. diciembre de 2010;22(4):327-32.
374. Saibeni S, Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Lecchi A, Lombardi R, et al. Low vitamin B(6) plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: role of inflammation and correlation with acute phase reactants. *Am J Gastroenterol*. enero de 2003;98(1):112-7.
375. Sakakeeny L, Roubenoff R, Obin M, Fontes JD, Benjamin EJ, Bujanover Y, et al. Plasma Pyridoxal-5-Phosphate Is Inversely Associated with Systemic Markers of Inflammation in a Population of U.S. Adults¹²³. *J Nutr* [Internet]. julio de 2012 [citado 28 de junio de 2018];142(7):1280-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3374666/>
376. Hirose T, Shimizu K, Ogura H, Tasaki O, Hamasaki T, Yamano S, et al. Altered balance of the aminogram in patients with sepsis - the relation to mortality. *Clin Nutr Edinb Scotl*. febrero de 2014;33(1):179-82.
377. Schindler K, Zauner C, Buchmayer H, Födinger M, Wöfl G, Bieglmayer C, et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia in critically ill patients. *Crit Care Med*. abril de 2000;28(4):991-5.
378. Woodside JV, Yarnell JW, McMaster D, Young IS, Harmon DL, McCrum EE, et al. Effect of B-group vitamins and antioxidant vitamins on hyperhomocysteinemia: a double-blind, randomized, factorial-design, controlled trial. *Am J Clin Nutr*. mayo de 1998;67(5):858-66.
379. Peng Y, Dong B, Wang Z. Serum folate concentrations and all-cause, cardiovascular disease and cancer mortality: A cohort study based on 1999-2010 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Int J Cardiol*. 15 de septiembre de 2016;219:136-42.

380. Unal AU, Kostek O, Takir M, Caklili O, Uzunlulu M, Oguz A. Prognosis of patients in a medical intensive care unit. *North Clin Istanbul*. 2015;2(3):189-95.
381. Sviri S, Khalaila R, Daher S, Bayya A, Linton DM, Stav I, et al. Increased Vitamin B12 levels are associated with mortality in critically ill medical patients. *Clin Nutr Edinb Scotl*. febrero de 2012;31(1):53-9.
382. Cappello S, Cereda E, Rondanelli M, Klersy C, Cameletti B, Albertini R, et al. Elevated Plasma Vitamin B12 Concentrations Are Independent Predictors of In-Hospital Mortality in Adult Patients at Nutritional Risk. *Nutrients*. 23 de diciembre de 2016;9(1).
383. Tsantes A, Tsangaris I, Nikolopoulos G, Bagos P, Kopterides P, Antonakos G, et al. The effect of homocysteine on the clinical outcomes of ventilated patients with severe sepsis. *Minerva Anesthesiol*. octubre de 2010;76(10):787-94.
384. Ermens A a. M, Vlasveld LT, Lindemans J. Significance of elevated cobalamin (vitamin B12) levels in blood. *Clin Biochem*. noviembre de 2003;36(8):585-90.
385. Wexler O, Gough MS, Morgan MAM, Mack CM, Apostolakos MJ, Doolin KP, et al. Methionine Metabolites in Patients With Sepsis. *J Intensive Care Med*. enero de 2018;33(1):37-47.
386. Bloos F, Reinhart K. Rapid diagnosis of sepsis. *Virulence* [Internet]. 1 de enero de 2014 [citado 9 de septiembre de 2019];5(1):154-60. Disponible en: <https://doi.org/10.4161/viru.27393>
387. Reinhart K, Meisner M, Brunkhorst FM. Markers for Sepsis Diagnosis: What is Useful? *Crit Care Clin* [Internet]. 1 de julio de 2006 [citado 9 de septiembre de 2019];22(3):503-19. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749070406000169>
388. Dahaba AA, Metzler H. Procalcitonin's role in the sepsis cascade. Is procalcitonin a sepsis marker or mediator? *Minerva Anesthesiol*. 2009;75(7-8):447-52.
389. Tsokos M, Reichelt U, Jung R, Nierhaus A, Püschel K. Interleukin-6 and C-reactive protein serum levels in sepsis-related fatalities during the early postmortem period. *Forensic Sci Int* [Internet]. 1 de junio de 2001 [citado 9 de septiembre de 2019];119(1):47-56. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073800003911>

390. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* [Internet]. 15 de junio de 2003 [citado 9 de septiembre de 2019];111(12):1805-12. Disponible en: <https://www.jci.org/articles/view/18921>
391. Zhang Y, Khalid S, Jiang L. Diagnostic and predictive performance of biomarkers in patients with sepsis in an intensive care unit. *J Int Med Res*. enero de 2019;47(1):44-58.
392. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* [Internet]. 1 de mayo de 2010 [citado 9 de septiembre de 2019];22(5):347-52. Disponible en: <https://academic.oup.com/intimm/article/22/5/347/731415>
393. Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 1 de mayo de 2013 [citado 9 de septiembre de 2019];13(5):426-35. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309912703237>
394. Singh-Manoux A, Shipley MJ, Bell JA, Canonico M, Elbaz A, Kivimäki M. Association between inflammatory biomarkers and all-cause, cardiovascular and cancer-related mortality. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can*. 13 de marzo de 2017;189(10):E384-90.
395. Ricarte-Bratti JP, Brizuela NY, Jaime-Albarran N, Montrull HL. IL-6, MMP 3 and prognosis in previously healthy sepsis patients. *Rev Fac Cienc Medicas Cordoba Argent*. 2017;74(2):99-106.
396. Weidhase L, Wellhöfer D, Schulze G, Kaiser T, Drogies T, Wurst U, et al. Is Interleukin-6 a better predictor of successful antibiotic therapy than procalcitonin and C-reactive protein? A single center study in critically ill adults. *BMC Infect Dis*. 13 de febrero de 2019;19(1):150.
397. Shahkar L, Keshtkar A, Mirfazeli A, Ahani A, Roshandel G. The role of IL-6 for predicting neonatal sepsis: A systematic review and meta-analysis. *Iran J Pediatr*. 2011;21(4):411-7.
398. Ma L, Zhang H, Yin Y-L, Guo W-Z, Ma Y-Q, Wang Y-B, et al. Role of interleukin-6 to differentiate sepsis from non-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Cytokine*. 2016;88:126-35.

-
399. Yende S, Kellum JA, Talisa VB, Peck Palmer OM, Chang C-CH, Filbin MR, et al. Long-term Host Immune Response Trajectories Among Hospitalized Patients With Sepsis. *JAMA Netw Open*. 2 de agosto de 2019;2(8):e198686.
400. Shapiro NI, Howell MD, Talmor D, Nathanson LA, Lisbon A, Wolfe RE, et al. Serum lactate as a predictor of mortality in emergency department patients with infection. *Ann Emerg Med*. mayo de 2005;45(5):524-8.
401. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med*. enero de 2008;36(1):296-327.
402. De Oro N, Gauthreaux ME, Lamoureux J, Scott J. The Use of Procalcitonin as a Sepsis Marker in a Community Hospital. *J Appl Lab Med*. 2019;3(4):545-52.
403. Mogensen KM, Lasky-Su J, Rogers AJ, Baron RM, Fredenburgh LE, Rawn J, et al. Metabolites Associated With Malnutrition in the Intensive Care Unit Are Also Associated With 28-Day Mortality. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2017;41(2):188-97.
404. Miroliaee AE, Salamzadeh J, Shokouhi S, Fatemi A, Ardehali SH, Hajiesmaeili MR, et al. Effect of Vitamin D Supplementation on Procalcitonin as Prognostic Biomarker in Patients with Ventilator Associated Pneumonia Complicated with Vitamin D Deficiency. *Iran J Pharm Res IJPR*. 2017;16(3):1254-63.
405. Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS. Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 alpha-hydroxylase. *Mol Cell Endocrinol*. 27 de febrero de 2004;215(1-2):31-8.
406. Liu V, Escobar GJ, Greene JD, Soule J, Whippy A, Angus DC, et al. Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. *JAMA*. 2 de julio de 2014;312(1):90-2.
407. Dürr UHN, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. septiembre de 2006;1758(9):1408-25.
408. Wolf TA, Wimalawansa SJ, Razzaque MS. Procalcitonin as a biomarker for critically ill patients with sepsis: Effects of vitamin D supplementation. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 1 de octubre de 2019 [citado 17 de octubre de 2019];193:105428. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076019300755>
-

PUBLICACIÓN DE CALIDAD

8. Publicación de calidad.

Critical Care (2019). Volumen 23. Número 162.

<https://doi.org/10.1186/s13054-019-2450-5>

PYROGLUTAMIC ACIDOSIS BY GLUTATHIONE REGENERATION BLOCKAGE IN CRITICAL PATIENTS WITH SEPTIC SHOCK

Yenifer Gamarra^{a,b}, Felipe C. Santiago^c, Jorge Molina-López^a, José Castaño^c, Lourdes Herrera-Quintana^a, Álvaro Domínguez^a, Elena Planells^a

^aDepartment of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, Health Campus, University of Granada, 18071, Granada, Spain. ^bClinical Analysis Unit, San Cecilio Hospital, 18016, Granada. Spain. ^cIntensive Care Unit, Virgen de las Nieves Hospital, 18014, Granada, Spain

Abstract

Aim. The aim of this study was to evaluate oxidative stress from glutathione depletion in critically ill patients with septic shock through the abnormal presence of pyroglutamic acid (PyroGlu) in urine (indirectly) and through its serum level (directly).

Methods. This was a prospective analytical study of 28 critically ill patients with septic shock who were monitored from admission (initial) to three days of stay (final) in the Intensive Care Unit (ICU). Data collected included PyroGlu and glutamic acid (Glu) using liquid chromatography/mass spectrometry, and glutathione peroxidase (GPX) activity with a colorimetric assay. The differences in Glu, PyroGlu and GPX activity between the septic shock group and healthy control group serving as reference values were evaluated using the Mann–Whitney test. The correlations between Glu, PyroGlu and GPX activity and clinical outcomes were determined using Spearman’s correlation coefficient.

Results. In patients with septic shock, serum and urine PyroGlu levels were higher, erythrocyte GPX activity/gr Hb was lower, and urine Glu levels were lower compared to healthy control reference values, for both initial and final values. Initial serum Glu levels were also lower. Serum PyroGlu levels had a correlation with both initial and final serum Glu levels; levels also correlated in urine. Initial serum Glu correlated with the days of mechanical ventilation ($P = 0.016$) and the days of ICU stay ($P = 0.05$). Urine Glu/mg creatinine correlated with APACHE II ($P = 0.030$). This positive correlation observed for serum Glu wasn’t observed for PyroGlu.

Conclusions. The current study found that septic patients have higher levels of PyroGlu, lower levels of Glu and lower erythrocyte GPX activity, suggesting that these biomarkers could be used as an indicator of glutathione depletion. In addition, Glu is related to severity parameters. This study can guide future studies on the importance of monitoring the levels of pyruvoglutaric acidosis in critical patients with septic shock in order to preserve the oxidative status and its evolution during the stay in the ICU.

Keywords. septic shock, pyroglutamic acid, glutathione peroxidase, glutamic acid, critical patient, glutathione

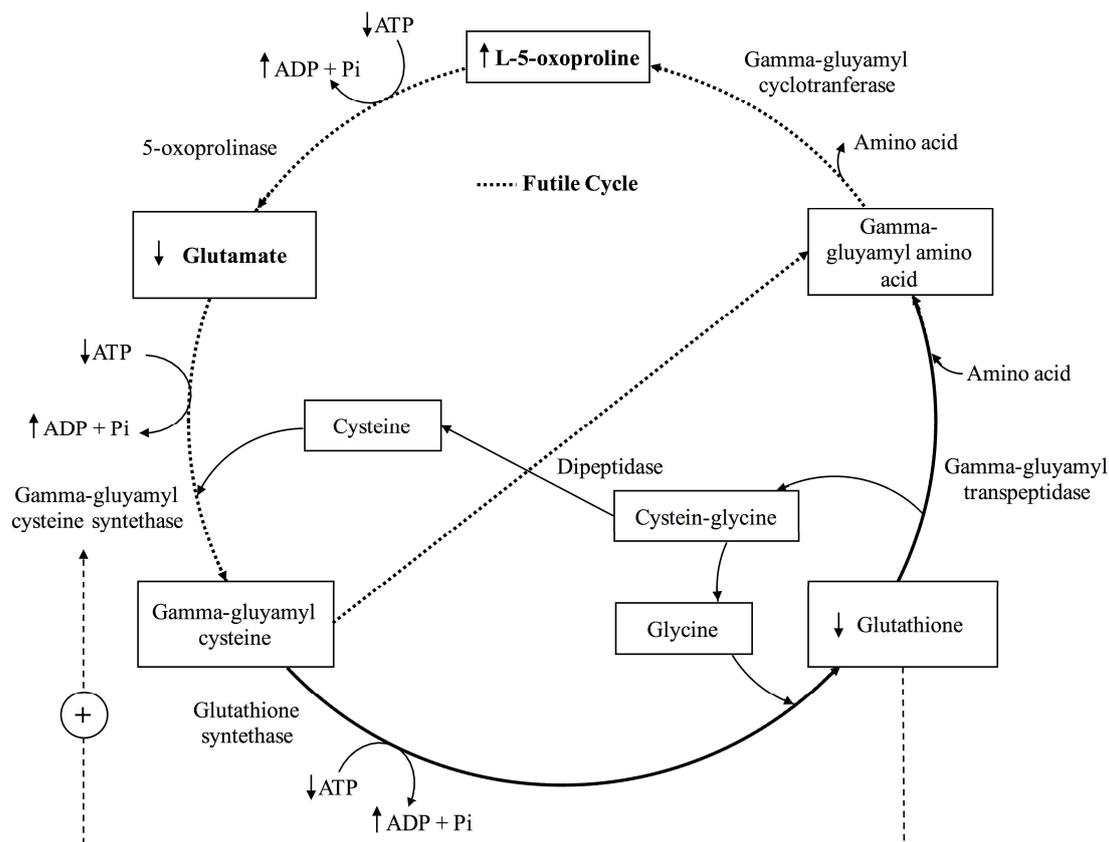
BACKGROUND

Septic shock is the leading cause of death in the Intensive Care Unit (ICU), and despite increased knowledge about the pathogenesis of sepsis, its mortality rate remains high, approximately 20% to 80% [1–3]. The excess oxidative stress in sepsis is produced by both an excess production of free radicals and a deficit in antioxidant defenses (scavengers). One of the most important and most abundant defensive antioxidant systems is the GPX enzyme family (GPX). These enzymes require reduced glutathione (GSH) for its action. One member of the GPX enzyme family is cellular glutathione peroxidase (GPX1), whose function is to detoxify peroxides in the cell. GPX1 is found in the cytoplasm of cells, especially red blood cells, and its main function is to protect hemoglobin from the action of free radicals. Other enzymatic families with an important role in antioxidant defense is the thioredoxin reductase.

Glutathione (GSH) is a non-protein tripeptide consisting of three amino acids: glutamate, cysteine and glycine. More than 90% of total glutathione is in the reduced form (GSH) and less than 10% is in the disulfide form (GSSG). An increase in the ratio between GSSG and GSH is an indicator of oxidative stress. Morris et al. described how GSH works to modulate the behavior of many cells, conferring protection against microbial, viral and parasitic infections [4]. It is well-known that the increase in oxidative stress causes the decrease in GSH levels [5–8]. GSH biosynthesis by way of the gamma-glutamyl cycle is important for maintaining GSH homeostasis and normal redox status, this cycle can be seen in **Figure 1**. The function of this cycle, proposed by Alton Meister [9], is the transfer of amino acids, finally reaching glutathione synthesis [10]. Glutathione is decomposed into a gamma-glutamyl amino acid through gamma-

glutamyl transpeptidase. Gamma-glutamyl amino acid is converted to pyroglutamic acid (PyroGlu) through gamma-glutamyl cyclotransferase. PyroGlu is converted to glutamic acid (Glu) through 5-oxoprolinase. Glu is converted to gamma-glutamylcysteine through gamma-glutamylcysteine synthetase. Finally, glutathione is synthesized by glutathione synthetase.

Figure 1. Gamma-glutamyl cycle.



Decreased levels of cellular glutathione lead to decreased feedback inhibition of gamma-glutamylcysteine synthetase, low glutathione levels would activate this enzyme. Under normal condition, high glutathione levels inhibit of gamma-glutamylcysteine synthetase. This results in excessive formation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine, which is converted by gamma-glutamylcyclo transferase into pyroglutamic acid. The overproduction of pyroglutamic acid exceeds the capacity of 5-oxoprolinase, and pyroglutamic acid therefore accumulates in body fluids and is excreted in the urine [52]. This mechanism also explains the glutamic acid levels since the reaction catalyzed by 5-oxoprolinase is slower because it depends on ATP.

The importance of the role of PyroGlu in critically ill patients is not well documented. The acquired form of pyroglutamic acid or 5-oxoproline (PyroGlu) metabolic acidosis was first described in 1989. Since then, this cause of chronic anion gap metabolic acidosis has been increasingly recognized. Many cases go unrecognized because an assay for PyroGlu is limited in daily clinical practice. Thus, the excess

PyroGlu in a septic patient without an enzymatic deficit in the gamma-glutamyl cycle could be associated with GSH depletion, and therefore excessive oxidative stress and its negative consequences. A decrease in GSH can be due to three reasons: (I) a decrease in ATP prevents the enzyme 5-oxoprolinasa (ATP-dependent) from converting PyroGlu into Glu, causing PyroGlu to accumulate and thus the gamma-glutamyl cycle becomes blocked; (II) GSH depletion due to the GSH demand caused by the need to eliminate free radicals since the patient is in a state of increased oxidative stress; (III) the activation of the enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase that helps the futile cycle to continue without synthesizing GSH. In other words, the high presence of PyroGlu contributes even further to GSH deficiency and would be an indicator of high oxidative stress. The blocking of the cycle by low ATP, is more likely associated with a decrease of cysteine bioavailability. This cysteine bioavailability decrease could be expected in a situation of increased requirement of cysteine for the protein synthesis in immune cells. The blocking of the cycle is expecting to increase the GSH depletion, but more as a consequence than a cause. From these analyses, the concentrations of Glu and PyroGlu can be correlated with clinical outcomes. Therefore, the aim of this study was to assess pyroglutamic acidemia as an increased oxidative stress predictor, since it contributes to GSH depletion in critically ill patients with septic shock, its association with morbidity and mortality and its evolution after three days.

MATERIALS AND METHODS

Study design and patients

The design was a prospective analytical study monitoring critically ill patients from admission until the third day of their stay in the ICU of Virgen de las Nieves Hospital in Granada (Spain). The study was approved by the hospital's Ethical Committee and informed consent was obtained from the patients or their family who had agreed to participate in the study. A total of 28 consecutive patients aged 18 years or older who were admitted to the ICU were included in the study following consensus criteria of septic shock [2]. The patients' medical histories did not show they were deficient in any enzyme of the gamma-glutamyl cycle. Patients underwent parenteral or enteral nutrient support but were not enriched with glutamine.

The following data was recorded on the day of inclusion in the study (initial) and on the third day (final): patient age, diagnosis, sex, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) score, Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score, ICU length of stay, patient 28-day mortality, and cardiocirculatory parameters.

Blood collection and handling

Initial and final blood and urine samples were collected. Blood and urine samples were centrifuged immediately at 3,500 rpm for 10 min at 4°C and serum was collected. Serum and urine samples were stored at -80°C prior to biochemical analyses for subsequent testing. The reference values of PyroGlu, Glu and GPX1 activity are unknown. 28 serum and urine samples from healthy patients were obtained to be used as reference values, and these were also frozen at -80°C. The origin of the control healthy people is from Granada region.

Biochemical parameters

The following initial and final data was recorded: blood biochemical profile (acid-base balance: pH and anion gap), renal function (creatinine, urea and ions), liver function (GOT, GPT and bilirubin), nutrition parameters (albumin, prealbumin, ferritin, transferrin, folic acid and vitamin B12 [Vit B12]), hematimetric and inflammatory parameters (C-reactive protein [CRP] and procalcitonin [PCT]).

Assessment of pyroglutamic acid and glutamic acid

The urine and serum samples were thawed and proteins from the samples were precipitated with acetonitrile. 0.3 mL of sample was placed in an Eppendorf tube and 0.3 mL of 12.5% acetonitrile was added. Acetonitrile preparation (1/8): 10 mL of acetonitrile was placed in a test tube and completed with distilled water to 80 mL. The samples were shaken and then incubated at room temperature, maintaining them with circular shaking motion for 30 min. The samples were centrifuged at 14,000 revolutions per minute for 5 min, then 0.2 mL of the supernatant was transferred to the screw cap bottle. Afterwards, the samples were processed. PyroGlu and Glu levels were obtained using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS).

Assessment of erythrocyte glutathione peroxidase activity (GPX1 activity)

The GPX1 activity of red blood cell hemolysate was assessed with a colorimetric assay using the Bioxytech® kit (OxisResearch™). Aliquots of erythrocytes were mixed into the four volumes of distilled water and centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes at 4°C, followed by the addition of 3× Assay Buffer. Enzyme activity was evaluated at 25°C at a wavelength of 340 nm, and the results were expressed in units per gram of hemoglobin.

Assessment of selenium

The determination of Se in patients' plasma was carried out in the Center of Scientific Instrumentation at the University of Granada with the inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method, using a Perkin-Elmer mass spectrometer with a plasma torch ionization source and quadrupole Nex ION 300D ion filter.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 21.0. Qualitative variables were presented as frequencies and percentages, and quantitative variables as mean ± standard deviation (SD). For continuous variables, the assumption of normality was tested using the Shapiro-Wilk test. The differences in Glu, PyroGlu and GPX1 activity between the septic shock patient group and healthy control group as reference values were evaluated using the Mann–Whitney test. In order to analyze the relationship between severity, ventilation and clinical parameters and both urine and serum Glu and PyroGlu acid levels and erythrocyte GPX1 activity, the cut-off scores were established by the median (low levels vs high levels). The correlations between Glu, PyroGlu and GPX1 activity and clinical outcomes were determined using Spearman's correlation coefficient. Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

RESULTS

Patient characteristics

During the study period, a total of 28 patients admitted to the ICU were enrolled. Clinical characteristics are shown in **Table 1**. The gender distribution of the sample was 22 male patients (78.6%) and 6 female patients (21.4 %) with a mean age (SD) of 61.9 ± 14.1 years. The original cause of septic shock was of abdominal (50%), urinary (21%)

and respiratory (29%) origin. The majority of the cases had underlying diseases such as cardiocirculatory diseases, hyperlipidemia, diabetes, chronic obstructive pulmonary disease, malignancy, etc. Two cases had HBV, another HIV disease and another only hypothyroidism, which could interfere in the depletion of antioxidants. The microorganisms that caused the infection were one *Acinetobacter*, three *Streptococci*, one *Pseudomonas*, one *Candida Albicans*, one *Campylobacter*, one *Clostridium* and the rest were *E. coli*. The APACHE II score was 22.0 (17-27) at admission. The SOFA score was 12.4 ± 2.60 and 8.88 ± 4.40 at admission and on the third day, respectively. The final SOFA score decreased ($P < 0.011$). A total of 15 patients needed mechanical ventilation (53.6%) and the mean length of stay in the ICU was 7.04 ± 10.49 days. The observed 28-day mortality was 42.9% (12 patients), 8 patients died in less than 72 hours. Anion gap was associated with initial APACHE II ($P < 0.001$).

Table 1. Clinical characteristics initial and final, and the evolution after three days, of critically ill septic shock patients.

	Initial (mean \pm SD) n = 28	Final (mean \pm SD) n = 14	P Value
Age, (years)	61.9 \pm 14.1	-	-
Male, number (%)	22 (78.6%)	-	-
Albumin (gr/dL)	2.72 \pm 0.61	2.66 \pm 0.65	0.139
Prealbumin (mg/dL)	12.67 \pm 6.72	16.95 \pm 10.67	0.143
Ferritin (ng/mL)	678.7 \pm 946.6	529.3 \pm 450.1	0.707
Transferrin (mg/dL)	139.3 \pm 57.1	148.1 \pm 51.3	0.514
SOFA score	12.4 \pm 2.6	8.8 \pm 4.4	0.011
APACHE II score	22.0 (17-27)	-	-
Sepsis focus, number (%)			
Respiratory	14 (50%)	-	-
Urinary	6 (21%)	-	-
Abdominal	8 (29%)	-	-
SBP (mmHg)	67.1 \pm 15.9	79.6 \pm 10.9	0.009
FiO2 (%)	0.56 \pm 0.17	0.40 \pm 0.14	0.001
PaO2/FiO2	231.5 \pm 81.6	240.1 \pm 98.8	0.494

Values are expressed as mean \pm standard deviation; Fourth column shows the statistical significance after applying the comparison of means for related samples, thus, the evolution is shown after three days. SBP: Systolic Blood Pressure. PaO2/FiO2: Partial Oxygen Arterial Pressure/Fraction of Inspired Oxygen.

Biochemical variables

Initial and final biochemical parameters and the evolution after three days in patients with septic shock are shown in **Table 2**. Patients met the clinical criteria for septic shock. All the parameters were abnormal, with very high levels of CRP and PCT

(as acute markers of inflammation and infection), while the markers for renal and hepatic insufficiency, as well as metabolic acidemia, were also very high.

Table 2. Initial and final biochemical parameters, and the evolution after three days in patients with septic shock.

	Initial (mean ± SD) n = 28	Final (mean ± SD) n = 14	Reference values	P value initial – final
pH	7.32 ± 0.09	7.38 ± 0.11	7.35 – 7.45	0.354
Anion gap (mmol/L)	12.1 ± 4.2	7.2 ± 10.7	7 - 16	0.079
Lactic acid (mmol/L)	4.72 ± 1.98	2.39 ± 2.17	0.6 – 2.5	0.008
Creatinine (mg/dL)	2.99 ± 1.47	2.35 ± 1.64	0.67 – 1.20	0.097
GOT or AST (U/L)	186.4 ± 299.6	964.1 ± 1947.5	5 - 40	0.255
GPT or ALT (U/L)	112.6 ± 128.3	506.4 ± 779.3	13 - 37	0.143
Total bilirubin (mg/dL)	2.37 ± 3.04	2.79 ± 3.07	0.3 – 1.2	0.431
CRP (mg/L)	35.1 ± 28.9	46.7 ± 53.5	0.02 - 5	0.679
Procalcitonin (ng/mL)	75.5 ± 59.3	42.6 ± 65.9	< 0.5	0.017
LDH (U/L)	620.0 ± 473.8	1285.9 ± 2130.7	110 - 295	0.211
Leukocytes (*10³/μL)	15.3 ± 17.9	13.3 ± 68.4	3.5 – 10.5	0.816
Neutrophils (%)	84.7 ± 16.2	86.1 ± 6.0	42 - 77	0.241
Hemoglobin (g/dL)	11.2 ± 2.5	9.4 ± 2.1	11 - 17	0.001
Vitamin B12 (pg/mL)	976.4 ± 511.0	1118.7 ± 192.2	116 - 513	0.261

Values are expressed as mean ± standard deviation; Fifth column shows the statistical significance after applying the comparison of means for related samples, thus, the evolution is shown after three days. GOT or AST, glutamic oxaloacetic transaminase or aspartate transaminase; GPT or ALT, glutamic pyruvic transaminase or alanine transaminase; CRP, C-reactive protein.

Comparative analysis of serum and urine Glu and PyroGlu levels and erythrocyte GPX1 activity

Table 3 shows the differences between patients with septic shock and reference values as controls for serum and urine PyroGlu, serum and urine Glu (urine results have also been expressed divided by creatinine [/Crea]), serum and erythrocyte Se, and GPX1 activity (which has also been expressed divided by grams of Hb [/Hb]). The control samples were taken from 28 healthy patients with normal test results and similar ages. There were statistically significant differences found between initial and final values for urine PyroGlu/Crea levels (P = 0.002), urine Glu levels (P < 0.026) and GPX1/Hb activity (P = 0.008). In all three cases, the final levels increased, except in the case of Glu/Crea which was not significant. Serum and erythrocyte Se showed a statistically

significant decrease ($P = 0.001$) between initial and final values. However, no differences were found between initial and final serum Glu levels ($P = 0.109$) and serum PyroGlu levels ($P = 0.075$).

Table 3. Serum and urine pyroglutamic acid, serum and urine glutamic acid, and erythrocyte glutathione peroxidase activity in patients with septic shock compared with healthy control as reference values, and the evolution after three days, are shown in this table.

	Reference values (n = 28) (mean \pm SD)	Cases initial (n = 28) (mean \pm SD)	Cases final (n = 14) (mean \pm SD)	P value initial	P value final	P value Cases initial – cases final
Serum pyroglutamic acid ($\mu\text{g/L}$)	399.9 \pm 77.1	696.7 \pm 273.0	992.3 \pm 442.6	0.001	0.001	0.075
Urine pyroglutamic acid ($\mu\text{g/L}$)	400.7 \pm 234.5	522.9 \pm 356.1	1790.3 \pm 431.8	0.153	0.010	0.021
Urine pyroglutamic acid ($\mu\text{g/mg creatinine}$)	0.40 \pm 0.32	2.03 \pm 2.29	3.92 \pm 1.89	0.001	0.001	0.002
Serum glutamic acid ($\mu\text{g/L}$)	8.03 \pm 2.73	5.74 \pm 1.66	7.48 \pm 2.26	0.001	0.497	0.190
Urine glutamic acid ($\mu\text{g/L}$)	30.3 \pm 15.7	7.1 \pm 4.7	13.2 \pm 6.8	0.001	0.001	0.026
Urine glutamic acid ($\mu\text{g/mg creatinine}$)	0.30 \pm 0.18	0.24 \pm 0.16	0.53 \pm 0.45	0.196	0.103	0.092
Serum selenium ($\mu\text{g/L}$)	76.93 \pm 18.14	56.03 \pm 12.95	41.65 \pm 11.46	0.001	0.001	0.001
Erythrocyte selenium ($\mu\text{g/L}$)	108.7 \pm 23.3	79.6 \pm 14.9	68.2 \pm 15.1	0.001	0.001	0.001
Erythrocyte glutathione peroxidase activity (mU/mL)	3980.5 \pm 777.5	1265.3 \pm 661.5	1412.7 \pm 591.4	0.001	0.001	0.154
Erythrocyte glutathione peroxidase activity (U/gr Hb)	26.5 \pm 5.1	12.2 \pm 6.6	16.2 \pm 8.8	0.001	0.001	0.008

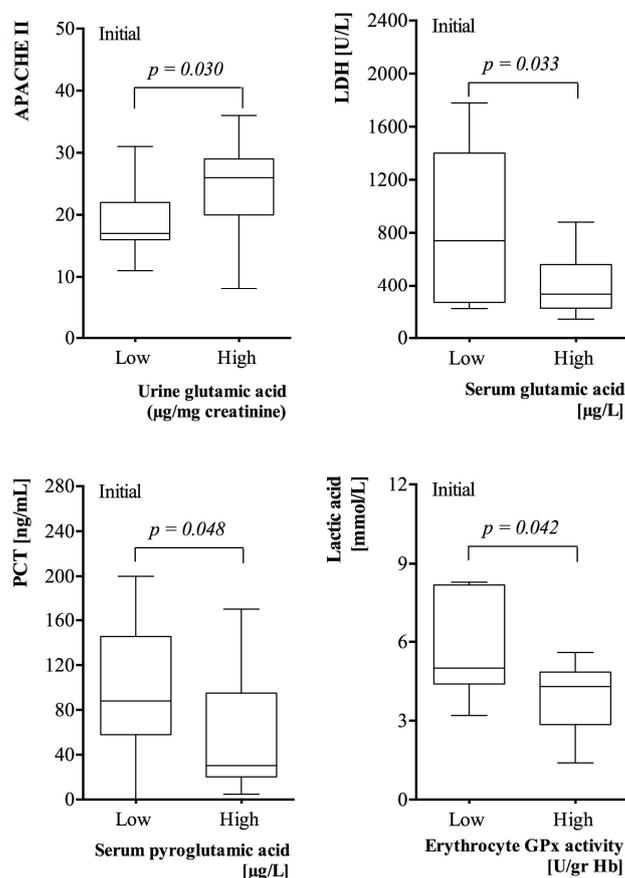
Values are expressed as mean \pm standard deviation. P (5th and 6th columns) = statistical significance of healthy control as reference values vs cases. P (7th column) = value Cases initial – cases final, show the evolution after three days. Fifth and sixth columns show the statistical significance after applying the difference of means for independent samples. Seventh column shows the statistical significance after applying the comparison of means for related samples.

Comparative analysis of severity, ventilation and clinical parameters for both urinary and serum Glu and PyroGlu acid levels and erythrocyte GPX1 activity

Figure 2 shows the comparative analysis of severity and clinical parameters for both urinary Glu and Pyro Glu levels, and initial erythrocyte GPX1 activity. Those patients with greater severity (APACHE II) showed higher levels of Glu in urine ($P < 0.05$). On the other hand, patients with clinical parameters such as low PCT, low LDH

and low lactic acid showed high levels of serum PyroGlu and Glu and erythrocyte GPX1/Hb activity, respectively ($P < 0.05$).

Figure 2. The comparative analysis of severity, ventilation (FiO_2) and clinical parameters (PCT, LDH and lactic acid) with both urinary and serum glutamic and pyroglutamic acid levels, and the erythrocyte GPX activity at initial.



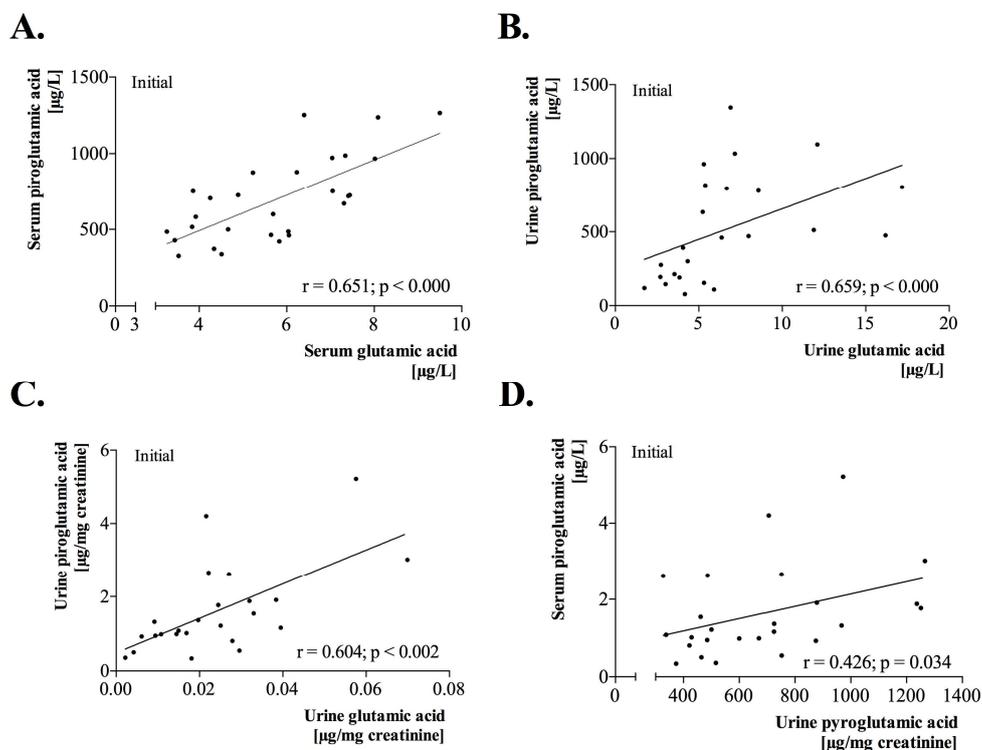
The cut-off scores were established by the median (low levels vs high levels).

Analysis of serum and urine Glu and PyroGlu and erythrocyte GPX1 activity correlation with inflammation and severity status

PyroGlu, Glu and GPX1 activity levels were associated with severity parameters (APACHE II, SOFA, days of mechanical ventilation, days of stay in ICU and age) and mortality. Positive correlations were observed between initial serum Glu and the days of mechanical ventilation ($r = 0.450$; $P = 0.016$) and the duration of ICU stay ($r = 0.372$; $P < 0.05$). This was also true for initial urine Glu/Crea with APACHE II ($r = 0.536$; $P = 0.030$). This correlation was not observed in the case of PyroGlu nor GPX1.

Figure 3 shows the Spearman's correlation analysis between PyroGlu and Glu in serum and urine. Serum PyroGlu levels had a significant correlation with both initial and final serum Glu levels ($r = 0.651$, $P < 0.001$) (**Figure 3A**) and ($r = 0.767$, $P < 0.001$), respectively. In the case of PyroGlu, a correlation between serum and urine/Crea was also observed ($r = 0.426$; $P < 0.034$) as shown in **Figure 3B**. Moreover, a correlation was observed between urine PyroGlu and Glu levels for both initial ($r = 0.659$, $P < 0.001$) (**Figure 3C**) and final values ($r = 0.665$, $P < 0.013$), and between initial urine PyroGlu/Crea and urine Glu/Crea levels ($r = 0.604$; $P = 0.002$) (**Figure 3D**).

Figure 3. Spearman's correlation analysis between pyroglutamic and glutamic acid in serum and urine.



DISCUSSION

In the current study, we set out to evaluate pyroglutamic acidemia in both serum and urine as an increased oxidative stress predictor in critically ill patients with septic shock as well as its association with clinical outcomes, morbidity and mortality and patient evolution in the ICU. Our major finding showed high serum and urine PyroGlu levels in critically ill patients. On the contrary, a decrease in serum levels and urine Glu levels as well as GPX1 activity was observed in these patients compared to the

reference values, although in the case of Glu, the urine decrease was not observed if it is expressed in accordance with mg of creatinine. This is the first time that PyroGlu has been determined in septic shock patients and compared with Glu, a metabolite of its cycle. As in this study, a decrease in Glu was also observed in patients with septic shock in other studies [11].

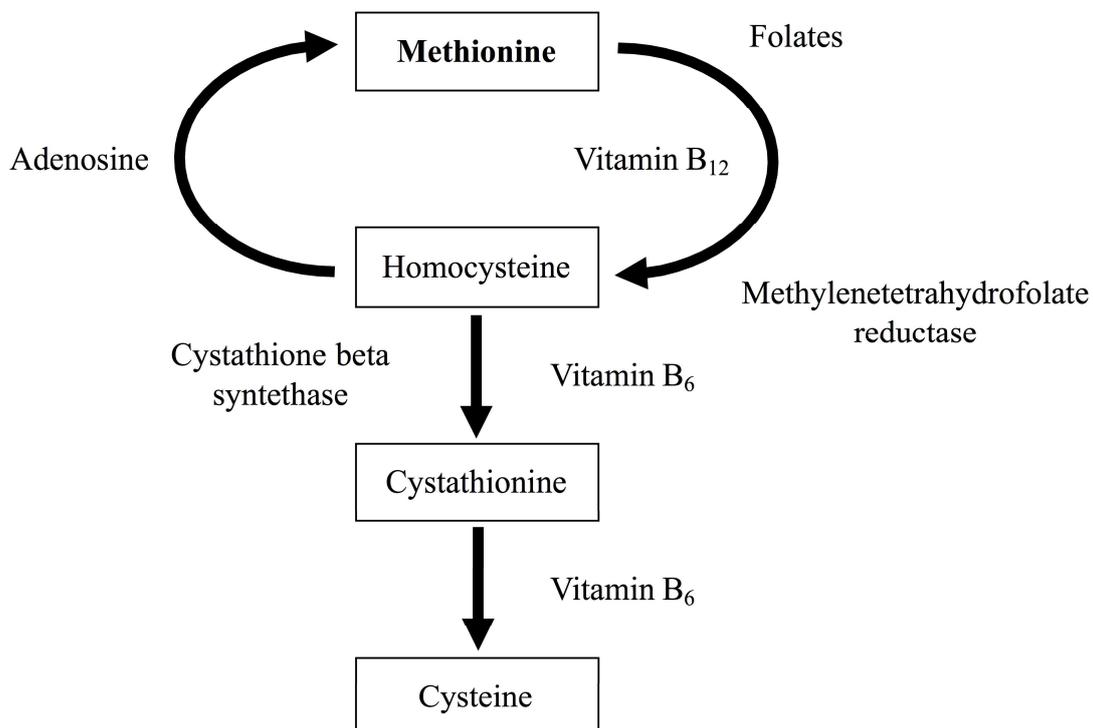
These disorders are attributed to glutathione depletion in the gamma-glutamyl cycle [12], the mechanism for which is shown in **Figure 1**. The increase in PyroGlu could be due to three key points: (I) the catabolism of GSH through gamma-glutamyl transpeptidase, (II) and/or to a limiting factor in the second step of gamma-glutamylcysteine synthetase (III) or a limiting factor in the following step involving glutathione synthetase. (II) The gamma-glutamylcysteine synthetase enzyme is the main rate-limiting step in this cycle and this reaction is non-allosterically inhibited by physiologic concentrations of glutathione. (III) The impact of a pre-existing ATP depletion in the successive step causes GSH not to be synthesized through glutathione synthetase, which can also be caused by glycine deficiency. Additionally, low levels of GSH increase gamma-glutamylcysteine synthase activity.

Under cysteine-limiting conditions, Glu is recycled into Glu (a futile cycle) via 5-oxoprolinase at the expense of two ATP molecules without GSH production and this is the reason for the decrease in GSH synthesis as well as the depletion of ATP in these cells [13]. This futile cycle is activated by the depletion of both glutathione and cysteine. The probable cysteine insufficiency will be developed later.

On the other hand, a disturbance can be observed in the levels of the components of the homocysteine cycle, which is shown in **Figure 4**. Basal homocysteine levels have been found to not be associated with the severity and mortality of septic patients [14]. In a study by Tsantes et al. [15], basal homocysteine levels in sepsis patients were observed to be within normal levels. However, the levels of vitB12 were higher, as in this study. According to the homocysteine cycle, the elimination of homocysteine is geared towards the formation of methionine through the increase of this vitamin (vit B12) and not towards the formation of cysteine. In addition, epidemiological evidence indicates that patients with inflammation have significantly lower blood levels of pyridoxal 5'-phosphate PLP (vit B6) than control subjects [16–18]. According to this study, there is a positive correlation between Glu and vit B12; that is to say, Glu

accumulates when vit B12 increases, since cysteine is not available for the gamma-glutamylcysteine synthetase to act to form gamma-glutamylcysteine, as shown in **Figure 1**. A study by Hirose et al. [19] revealed the minimum value of glutamate and maximum value of methionine to be significant prognostic factors for mortality in patients with sepsis.

Figure 4. Homocysteine cycle.



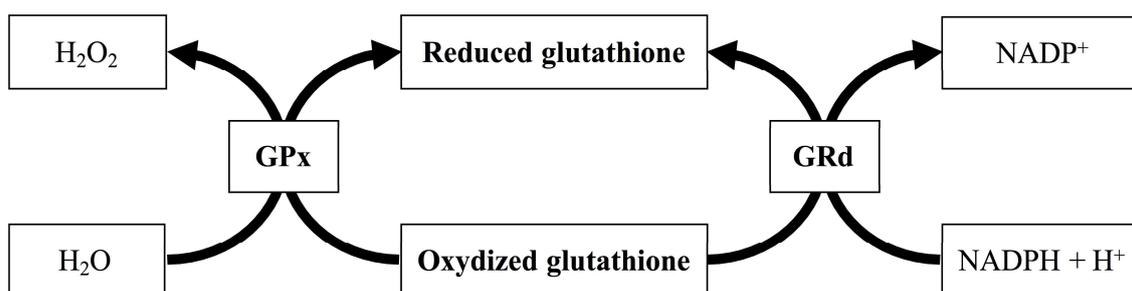
Cysteine is required for the formation of glutathione. Cysteine comes from homocysteine. Homocysteine also intervenes in the formation of methionine, for which it requires folic acid and vitamin B12.

There are correlations between PyroGlu, Glu and GPX1 activity and some biochemical, respiratory and severity markers. This shows the association between the parameters of the glutathione pathway and the metabolic alteration in these patients. Excess PyroGlu in a septic patient without enzymatic deficiency in the gamma-glutamyl cycle could be associated with the depletion of GSH, and therefore excessive oxidative stress and its negative consequences. Low GSH and increased GSSG are expected in a situation of oxidative stress and increase of redox potential. Nevertheless, the increase of PyroGlu and decrease of Glu seems more reflecting the low ATP cellular content

leading to a locking of gamma-glutamyl cycle from the first step requiring ATP after PyroGlu synthesis. GSH metabolism is demonstrated to be significantly altered by malnutrition and 28-day mortality in ICU patients [20]. In one study [21], blood GSH concentrations and synthesis rates were found to have decreased in children with sepsis, while blood GSH redox ratios (GSSG:GSH) were found to have increased [22], suggesting increased oxidative stress. Numerous studies associate low GSH levels with PyroGlu increase [23–25]. Likewise, high levels of PyroGlu are associated with high oxidative stress [26,27]. In a study by Metges et al. [28], it was confirmed that glycine or sulfur amino acid restriction alters PyroGlu kinetics and urinary excretion, another reason which explains how altering the precursors of GSH formation also alters the gamma-glutamyl cycle.

A significant decrease in the final SOFA score was observed as a consequence of the support measures carried out in the ICU. However, final PyroGlu increased significantly, without being affected by these measures. This may be a reason why there is no association between PyroGlu and clinical severity parameters. Therefore, PyroGlu might be considered as a glutathione depletion marker, which acts independently of severity scales. We propose that PyroGlu should be evaluated in critical patients with septic shock.

The overall redox potential of a cell is primarily determined by oxidizable/reducible chemical pairs, including GSH/GSSH, reduced thioredoxin/oxidized thioredoxin, NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH, as shown in **Figure 5**. Expending the known reduced species (NADH⁺, reduced glutathione, etc.) to “neutralize” the deleterious compounds weakens the organism's capacity to combat further oxidative stress. GPX1 is one of the most abundant members of the GPX family of enzymes. GPX family is present in all cells, primarily located in the cytosolic and mitochondrial compartments, as well as the peroxisomal compartment [29] in some cells. It has been found to be more effective than catalase at removing intracellular peroxides under many physiological conditions [30]. In this study, these patients have been observed to have GPX1 activity that does not contribute to the elimination of free radicals because it is decreased with respect to control patients. Although numerous studies have measured GPX1 activity in patients with sepsis, the results remain inconclusive [31,32].

Figure 5. Oxide reduced cycle.

Glutathione peroxidase-1 (GPX1) is an intracellular antioxidant enzyme that enzymatically reduces hydrogen peroxide to water to limit its harmful effects. GPX, Glutathione peroxidase; GRd, glutathione reductase.

As for Se levels, we found a significant decrease in plasma in relation to ICU stay. This decrease has been repeatedly observed in sepsis patients since 1998 [33]. It is related to the binding of selenoprotein-P to the endothelium in sepsis, to the protein extravasation at the early phase of sepsis, and to a down regulation of selenoprotein-P liver synthesis [32]. We found a significant decrease in erythrocytes in relation to ICU stay. Erythrocyte Se content does not interfere with sepsis. However, erythrocyte Se content is an accurate marker of Se status prior to septic shock [34–36] and is a good marker of longer-term Se status [37]. Certain parts of Granada's population with a possible low selenium intake [37], such as patients with HIV or cancer, could be concerned by such deficiency. Previous Se deficiency is expected to reduce resistance to oxidative stress. The variation in initial and final erythrocyte Se concentration might be related to transfusion, hemolysis, or the death of some patients. It has long been known that the lethal Keshan disease is related to major Se deficiency. This Se deficiency induced mortality from myocarditis caused by coxsackievirus infection [38]. Such disease has been prevented by Se food enrichment in the region of Keshan, China. We could not associate of Se with the other parameters studied, likely due to the size of our sample. Currently, it is admitted that a moderate increase of selenium administration compared to the daily requirement (with a maximum of about 300 µg/day) is largely sufficient in septic patients, even under dialysis or suffering extended burn. This dose is lower than the US Upper Limit. For the record the body selenium content is about 10 to 20 mg, and the plasma compartment contains only a small fraction of body selenium content (less than 2%). Se is included in GPX at the active site of the enzyme under the form of the aminoacid selenocystein, which is require for its activity; therefore,

supplementation is of vital importance in patients who do not have sufficient levels of Se. A prospective observational study [39] showed that erythrocyte Se concentration predicts mortality in patients with septic shock. High dose Se supplementation has not improved clinical outcome of septic shock patients [40], although these studies are controversial [41].

Thiol antioxidants such as N-acetyl-L-cysteine (NAC) have been shown to be beneficial against inflammation. Thus, along with its properties as an antioxidant, NAC will also increase GSH, possibly preserving or enhancing GPX1 function [42]. Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) plays key roles in GSH homeostasis by breaking down extracellular GSH and providing cysteine, the rate-limiting substrate, for the intracellular *de novo* synthesis of GSH. The presence of ROS and oxidative stress in sepsis, especially in septic shock, has led several studies to evaluate the role of NAC as adjuvant therapy [7,43–49]. It is also important to suspend medications such as paracetamol or flucoxacillin in patients who manifest pyroglutamic acidemia so as not to further contribute to its increase [50,51]. The key to the controversy surrounding the administration of NAC in these cases may be that these patients have depleted ATP and the last reaction of the detailed cycle (glutathione synthetase) is limited and GSH is not synthesized.

Oxidative stress determination is limited in daily clinical practice, primarily due to the difficulty in measuring the different aspects of oxidative stress, which entails several tests: oxidized glutathione, reduced glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase (GRd), etc. This study proposes using the parameter of PyroGlu as a predictor of oxidative stress due to GSH depletion. There is a significant positive correlation between PyroGlu in serum and in urine (**Figure 3B**); therefore, we could propose that it can be measured in urine since the sample is easier to obtain. Although PyroGlu is not routinely available in clinical laboratories, this study presents data that supports its usefulness, though more work is needed before being used in clinical practice.

CONCLUSIONS

Patients with septic shock manifest pyroglutamic acidosis that correlates with low levels of Glu (except urine Glu/Crea) which can be measured in both serum and urine,

and low GPX1/Hb activity. Glu is related to severity parameters and vit B12, although this relationship is not observed in the case of PyroGlu nor GPX1. The major contribution of this study is the strengthening of evidence to support the control of patients with pyroglutamic acidosis, in addition to proposing PyroGlu as way to measure oxidative stress. These results could offer new data that can lead to future studies on recognizing the increase in pyroglutamic acidosis as an indicator of GSH depletion.

Abbreviations

ICU, intensive care unit; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; GPX, glutathione peroxidase; GSH, glutathione; Glu, glutamic acid; PyroGlu, pyroglutamic acid; GPX1, cellular glutathione peroxidase; APACHE, acute physiology and chronic health evaluation; SOFA, sequential organ failure assessment; GOT or AST, glutamic oxaloacetic transaminase or aspartate transaminase; GPT or ALT, glutamic pyruvic transaminase or alanine transaminase; CRP, c-reactive protein; PCT, procalcitonin.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Ethical Committee of the hospital and informed consent was obtained from the patients or their family who had agreed to participate in the study.

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and materials

The datasets generated and analysed during the current study are not publicly available due the database is very extensive and includes data from other studies complementary to this, but are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Funding

Financial support for the study was provided by Project FIS PI10/1993 from the Spanish Carlos III Health Institute and FEDER European Funds. Astellas Pharma S.A. also contributed to the financing.

Authors' contributions

YG carried out the collection, analysis and interpretation of data and drafted the manuscript. FS and JC recruited the patients and collected de clinical data. JC, EP and YG carried out in study design. LH, JM and EP helped in the analysis and interpretation the data. AD, JM and EP helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank all: Hospitals (Virgen de las Nieves y San Cecilio. Granada), critically ill patients, ICU and Clinical Analysis Service personnel, Dr. Pérez de la Cruz, Dr. Rodríguez Elvira, Dr. De Haro Muñoz and Dr. Garrido Torres-Puchol. We also thank the CIC (Centre for Scientific Instrumentation. University of Granada), the CIBM (Biomedical Research Center. Granada), the Supported Unit for Investigation FIBAO (Foundation for the Health Investigation) and the Astellas Pharma S.A.

BIBLIOGRAPHY

1. Gerlach H, Keh D. Recent progress in sepsis epidemiology--have we learned enough? Crit Care Lond Engl. 2003;7:333–4.
2. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2016. Crit Care Med [Internet]. 2017 [cited 2018 Apr 19];45:486. Available from:

https://journals.lww.com/ccmjournals/Fulltext/2017/03000/Surviving_Sepsis_Campaign__International.15.aspx

3. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315:801–10.
4. Morris D, Khurasany M, Nguyen T, Kim J, Guilford F, Mehta R, et al. Glutathione and infection. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830:3329–49.
5. Yeligar SM, Harris FL, Hart CM, Brown LAS. Glutathione attenuates ethanol-induced alveolar macrophage oxidative stress and dysfunction by downregulating NADPH oxidases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306:L429-441.
6. Sekhar RV, Patel SG, Guthikonda AP, Reid M, Balasubramanyam A, Taffet GE, et al. Deficient synthesis of glutathione underlies oxidative stress in aging and can be corrected by dietary cysteine and glycine supplementation. *Am J Clin Nutr*. 2011;94:847–53.
7. Paterson RL, Galley HF, Webster NR. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit Care Med*. 2003;31:2574–8.
8. Homma T, Fujii J. Application of Glutathione as Anti-Oxidative and Anti-Aging Drugs. *Curr Drug Metab*. 2015;16:560–71.
9. Orłowski M, Meister A. The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970;67:1248–55.
10. Inoue M. Glutathionists in the battlefield of gamma-glutamyl cycle. *Arch Biochem Biophys*. 2016;595:61–3.
11. Poeze M, Luiking YC, Breedveld P, Manders S, Deutz NEP. Decreased plasma glutamate in early phases of septic shock with acute liver dysfunction is an independent predictor of survival. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2008;27:523–30.

12. Emmett M. Acetaminophen toxicity and 5-oxoproline (pyroglutamic acid): a tale of two cycles, one an ATP-depleting futile cycle and the other a useful cycle. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2014;9:191–200.
13. Kumar A, Bachhawat AK. A futile cycle, formed between two ATP-dependant gamma-glutamyl cycle enzymes, gamma-glutamyl cysteine synthetase and 5-oxoprolinase: the cause of cellular ATP depletion in nephrotic cystinosis? *J Biosci*. 2010;35:21–5.
14. Coelho Neto A, Azevedo RP, Santos MBP, Galdieri L de C, D’Almeida V, Amaral JLG do, et al. Homocysteine plasma levels as a marker of clinical severity in septic patients. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2010;22:327–32.
15. Tsantes A, Tsangaris I, Nikolopoulos G, Bagos P, Kopterides P, Antonakos G, et al. The effect of homocysteine on the clinical outcomes of ventilated patients with severe sepsis. *Minerva Anesthesiol*. 2010;76:787–94.
16. Saibeni S, Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Lecchi A, Lombardi R, et al. Low vitamin B(6) plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: role of inflammation and correlation with acute phase reactants. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:112–7.
17. Sakakeeny L, Roubenoff R, Obin M, Fontes JD, Benjamin EJ, Bujanover Y, et al. Plasma Pyridoxal-5-Phosphate Is Inversely Associated with Systemic Markers of Inflammation in a Population of U.S. Adults¹²³. *J Nutr [Internet]*. 2012 [cited 2018 Jun 28];142:1280–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3374666/>
18. Molina-López J, Florea D, Quintero-Osso B, de la Cruz AP, Rodríguez-Elvira M, Del Pozo EP. Pyridoxal-5'-phosphate deficiency is associated with hyperhomocysteinemia regardless of antioxidant, thiamine, riboflavin, cobalamine, and folate status in critically ill patients. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2016;35:706–12.
19. Hirose T, Shimizu K, Ogura H, Tasaki O, Hamasaki T, Yamano S, et al. Altered balance of the aminogram in patients with sepsis - the relation to mortality. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2014;33:179–82.

20. Mogensen KM, Lasky-Su J, Rogers AJ, Baron RM, Fredenburgh LE, Rawn J, et al. Metabolites Associated With Malnutrition in the Intensive Care Unit Are Also Associated With 28-Day Mortality. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2017;41:188–97.
21. Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, Ming-Yu Y, Lu XM, Zurakowski D, Curley M, et al. Cysteine metabolism and whole blood glutathione synthesis in septic pediatric patients. *Crit Care Med.* 2001;29:870–7.
22. Németh I, Boda D. Xanthine oxidase activity and blood glutathione redox ratio in infants and children with septic shock syndrome. *Intensive Care Med.* 2001;27:216–21.
23. Jackson AA, Gibson NR, Lu Y, Jahoor F. Synthesis of erythrocyte glutathione in healthy adults consuming the safe amount of dietary protein. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:101–7.
24. Lord RS, Bralley JA. Clinical applications of urinary organic acids. Part I: Detoxification markers. *Altern Med Rev J Clin Ther.* 2008;13:205–15.
25. Geenen S, Yates JWT, Kenna JG, Bois FY, Wilson ID, Westerhoff HV. Multiscale modelling approach combining a kinetic model of glutathione metabolism with PBPK models of paracetamol and the potential glutathione-depletion biomarkers ophthalmic acid and 5-oxoproline in humans and rats. *Integr Biol Quant Biosci Nano Macro.* 2013;5:877–88.
26. Yu Y-M, Ryan CM, Fei Z-W, Lu X-M, Castillo L, Schultz JT, et al. Plasma L-5-oxoproline kinetics and whole blood glutathione synthesis rates in severely burned adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E247-258.
27. Lord RS. Long-term patterns of urinary pyroglutamic acid in healthy humans. *Physiol Rep* [Internet]. 2016 [cited 2018 Aug 13];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4816898/>
28. Metges CC, Yu YM, Cai W, Lu XM, Wong S, Regan MM, et al. Oxoproline kinetics and oxoproline urinary excretion during glycine- or sulfur amino acid-free diets in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278:E868-876.

29. Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 2000;60:3927–39.
30. Antunes F, Han D, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1260–7.
31. Asci A, Surmeli-Onay O, Erkekoglu P, Yigit S, Yurdakok M, Kocer-Gumusel B. Oxidant and antioxidant status in neonatal proven and clinical sepsis according to selenium status. *Pediatr Int Off J Jpn Pediatr Soc.* 2015;57:1131–7.
32. Forceville X, Mostert V, Pierantoni A, Vitoux D, Le Toumelin P, Plouvier E, et al. Selenoprotein P, rather than glutathione peroxidase, as a potential marker of septic shock and related syndromes. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur.* 2009;43:338–47.
33. Forceville X, Vitoux D, Gauzit R, Combes A, Lahilaire P, Chappuis P. Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients. *Crit Care Med.* 1998;26:1536–44.
34. Ashton K, Hooper L, Harvey LJ, Hurst R, Casgrain A, Fairweather-Tait SJ. Methods of assessment of selenium status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:2025S-2039S.
35. Stefanowicz FA, Talwar D, O'Reilly DSJ, Dickinson N, Atkinson J, Hursthouse AS, et al. Erythrocyte selenium concentration as a marker of selenium status. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 2013;32:837–42.
36. Forceville X. Effects of high doses of selenium, as sodium selenite, in septic shock patients a placebo-controlled, randomized, double-blind, multi-center phase II study--selenium and sepsis. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS.* 2007;21 Suppl 1:62–5.
37. Millán Adame E, Florea D, Sáez Pérez L, Molina López J, López-González B, Pérez de la Cruz A, et al. Deficient selenium status of a healthy adult Spanish population. *Nutr Hosp.* 2012;27:524–8.

38. Levander OA. Selenium requirements as discussed in the 1996 joint FAO/IAEA/WHO expert consultation on trace elements in human nutrition. *Biomed Environ Sci BES*. 1997;10:214–9.
39. Costa NA, Gut AL, Pimentel JAC, Cozzolino SMF, Azevedo PS, Fernandes AAH, et al. Erythrocyte selenium concentration predicts intensive care unit and hospital mortality in patients with septic shock: a prospective observational study. *Crit Care Lond Engl*. 2014;18:R92.
40. Manzanares W, Lemieux M, Elke G, Langlois PL, Bloos F, Heyland DK. High-dose intravenous selenium does not improve clinical outcomes in the critically ill: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Lond Engl*. 2016;20:356.
41. Heyland DK. Selenium supplementation in critically ill patients: can too much of a good thing be a bad thing? *Crit Care Lond Engl*. 2007;11:153.
42. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2011 [cited 2018 Jun 21];15:1957–97. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3159114/>
43. Steckert AV, de Castro AA, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Sepsis in the central nervous system and antioxidant strategies with N-acetylcysteine, vitamins and statins. *Curr Neurovasc Res*. 2014;11:83–90.
44. Toklu HZ, Tunali Akbay T, Velioglu-Ogunc A, Ercan F, Gedik N, Keyer-Uysal M, et al. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, prevents sepsis-induced acute lung and brain injury. *J Surg Res*. 2008;145:214–22.
45. Ellouze O, Frikha N, Ouerghi S, Mestiri T, Salah Ben Ammar M. [N-acetylcysteine in septic shock]. *Tunis Med*. 2011;89:738–44.
46. Winiarska K, Drozak J. [Glutathione in therapy]. *Postepy Hig Med Dosw*. 2002;56:521–36.

47. Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology* Baltim Md. 2010;51:246–54.
48. Tanaka KAK, Kurihara S, Shibakusa T, Chiba Y, Mikami T. Cystine improves survival rates in a LPS-induced sepsis mouse model. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2015;34:1159–65.
49. Hulley SL, Perring J, Manning N, Olpin S, Yap S. Transient 5-oxoprolinuria: unusually high anion gap acidosis in an infant. *Eur J Pediatr*. 2015;174:1685–8.
50. Dempsey GA, Lyall HJ, Corke CF, Scheinkestel CD. Pyroglutamic acidemia: a cause of high anion gap metabolic acidosis. *Crit Care Med*. 2000;28:1803–7.
51. O'Brien LMN, Hooper M, Flemmer M, Marik PE. Chronic acetaminophen ingestion resulting in severe anion gap metabolic acidosis secondary to 5-oxoproline accumulation: an under diagnosed phenomenon. *BMJ Case Rep* [Internet]. 2012 [cited 2018 Nov 25];2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3391392/>
52. Ristoff E, Larsson A. Inborn errors in the metabolism of glutathione. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2007 [cited 2018 Jun 26];2:16. Available from: <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-16>

8.1. Indicios de calidad de la publicación.

Los resultados de la presente tesis doctoral han sido publicados en el artículo nombrado “Pyroglutamic acidosis by glutathione regeneration blockage in critical patients with septic shock” en la revista “**Critical Care**”. Esta revista pertenece al **primer cuartil (primer decil)** y tuvo un factor de impacto en **Journal of Citation Reports** en el 2018 de **6.425**. Enlace a la publicación: **[10.1186/s13054-019-2450-5](https://doi.org/10.1186/s13054-019-2450-5)**

Este estudio deriva del proyecto de investigación FIS PI10/1993 procedente del Instituto Carlos III y la Fundación Europea FEDER. También se obtuvo una financiación de la empresa Astellas Farma, S.A.

