

Efecto de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico y otros radicales libres en un modelo de peritonitis fecal en ratas

Cap. I/o. P. de M. Roberto **Padilla Barrales***, Cap. I/o. P. de M. Angel **Pantoja Vera***, M.M.C. Guadalupe Cleva **Villanueva López,**** Cor. M.C. José Luis **Amezcu Gastélum*****

RESUMEN. En diferentes modelos se ha evidenciado el papel del óxido nítrico (NO) en la descompensación del choque. En el presente estudio se valoró la participación del NO y de radicales libres en un modelo de peritonitis fecal producido por la administración de materia fecal autóloga en ratas. Se valoró el efecto de diversos tratamientos en la sobrevida después del reto, comparando en cada ocasión con un grupo control (tratado con vehículo y el reto). Se emplearon los inhibidores de la síntesis del NO N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) y N-imino etil-L-ornitina (L-NIO), alopurinol o hidrocortisona. La sobrevida fue mayor ($p < 0.001$) en los grupos tratados con hidrocortisona, alopurinol y L-NIO. El L-NAME no cambió la sobrevida cuando se administró simultáneo al reto y la disminuyó al darse 3 horas después. La combinación de L-NIO más alopurinol tampoco influyó en la sobrevida. Los resultados orientan hacia la participación del NO y radicales libres en el modelo estudiado.

Palabras clave: Óxido nítrico, peritonitis, alopurinol, radicales libres, hidrocortisona.

El choque séptico es la causa más frecuente de muerte en las unidades de cuidados intensivos.^{14,15} La sepsis se define como la respuesta inflamatoria sistémica a la infección que tiene como manifestaciones clínicas uno o más de los siguientes datos: temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$, frecuencia cardíaca > 90 latidos por minuto, frecuencia respiratoria > 20 respiraciones por minuto, PaCO_2 < 32 mmHg y leucocitos $> 12,000/\text{mm}^3$, $< 4,000$ o $> 10\%$ de formas inmaduras (bandas).¹

El choque séptico es una manifestación de sepsis severa y se define como la hipotensión inducida por sepsis que persiste a pesar de la adecuada reposición de líquidos y que

SUMMARY. The role of nitric oxide (NO) in decompensation of shock has been demonstrated in different models. In the present study the role of NO and free radicals was assessed in a model of faecal peritonitis produced through intraperitoneal autologous feces administration in rats by using different treatments and measuring survival time after challenge. Two NO synthesis inhibitors (N^G-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME and N-imino ethyl-L-ornithine, L-NIO), allopurinol and hydrocortisone were used. Survival time was longer ($p < 0.001$) in groups treated with hydrocortisone, allopurinol or L-NIO and did not change when L-NAME and the challenge were given simultaneously. However, L-NAME pretreatment (3 hours after the challenge) reduced survival time. L-NIO combined with allopurinol did not change survival time either. Results suggest a role of NO and free radicals in the model studied.

Key words: Nitric oxide, peritonitis, allopurinol, free radicals, hydrocortisone.

se acompaña de anomalías de hipoperfusión o disfunción orgánica.³ Es consecuencia de una infección bacteriana por Gram negativos, pero también puede ser causada por organismos Gram positivos, hongos, virus y parásitos.⁶

La peritonitis fecal puede ser primaria o secundaria. La primaria se observa con mayor frecuencia coincidiendo con una cirrosis hepática. La secundaria aparece cuando las bacterias contaminan el peritoneo como consecuencia del derrame o apertura a la cavidad peritoneal libre, de un proceso intraabdominal, predominando los microorganismos Gram negativos y anaerobios. La mortalidad que se presenta en estos casos se atribuye a la sepsis por estos microorganismos o sus toxinas.¹⁹ Las exotoxinas, la bacteria por sí misma y, en particular, los componentes de la pared celular, son los responsables primarios para el desarrollo de choque séptico.¹⁹ Se liberan radicales libres tóxicos y agentes vasoactivos a partir de células lesionadas.³

Durante la sepsis se han descrito dos patrones de respuesta, una fase temprana caracterizada por hipertonía simpática y una fase tardía en la que existe vasodilatación arterial profunda y aumento de la permeabilidad vascular, lo cual se ha asociado con la producción de componentes del complemento, productos tóxicos de moléculas de oxígeno, metabolitos del ácido araquidónico, el factor activador de

* Alumnos de 6o. año de estudios, Escuela Médico Militar.

** Jefa del Departamento de Farmacología, Escuela Médico Militar.

*** Subdirector de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

Correspondencia:

Cap. I/o. Pasante de Medicina Roberto Padilla Barrales
Maracaibo 105
Fracc. Las Américas
43040 Naucalpan, Edo. Méx.
Tel. 373-25-85

plaquetas y el óxido nítrico.¹⁷ Los radicales libres como el peróxido de hidrógeno, el superóxido y el anión hidroxilo son especies químicas que se producen en estados inflamatorios e infecciosos, así como durante la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas a partir del ácido araquidónico.⁷ Su producción se ha asociado a la muerte ocasionada con la sepsis por bacterias Gram negativas.¹⁰ El alopurinol que actúa como inhibidor de la xantina oxidasa, se ha utilizado como antioxidante en algunos modelos de sepsis.¹⁸

El óxido nítrico (NO) es un potente vasodilatador que se produce a partir del aminoácido L-arginina, por medio de las enzimas sintetazas de óxido nítrico (SNO).¹² Se han identificado dos tipos de SNO, una constitutiva dependiente de calcio que se activa por medio de acetilcolina y bradicinina, entre otros, y que libera cantidades picomolares de NO en las células del endotelio vascular, entre otras.¹² La sintetasa inducible es independiente de calcio y provoca la liberación sostenida de NO en cantidades nanomolares desde los macrófagos, neutrófilos, endotelio vascular y células gliales, siendo sus principales inductores las endotoxinas, el FNT alfa, IL-1 beta y el interferón gamma.¹² El NO posee acciones citotóxicas además de ser un potente vasodilatador.^{9,12} Se han caracterizado diferentes tipos de inhibidores de las SNO que actúan como análogos de la L-Arg, como el N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), el N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) que actúa preferentemente sobre la SNO constitutiva, y N-imino etil-L-ornitina (L-NIO) que actúa predominantemente sobre la SNO inducible.¹⁶

La hidrocortisona es un glucocorticoide que posee actividad antiinflamatoria, además, se ha demostrado que inhibe la inducción de la SNO inducible.^{4,9}

Material y métodos

Animales de experimentación. Se utilizaron ratas Wistar machos de 200 a 300 g de peso, alimentadas con Purina chow y agua *ad libitum*, las cuales permanecieron en el Bioterio de la Escuela Médico Militar por lo menos tres días antes del estudio sometidas a ciclos luz/oscuridad de 12/12 horas.

Producción de sepsis. Para la producción de peritonitis fecal en ratas se utilizó una suspensión de su propia materia fecal, a razón de 5 g/kg, el cual se produjo recolectando la materia fecal de 24 horas, se machacó en un mortero y se añadieron 2 mL de agua destilada por cada gramo de materia fecal, se filtró y se recolectó para su inyección intraperitoneal (i.p.).

Grupos experimentales. En cada serie experimental (Cuadro 1) los tratamientos se compararon con el vehículo. En todos los casos los animales se sometieron a ayuno, y a partir del tiempo 0 se permitió acceso libre a alimento y agua. En todos los casos se cuantificó la sobrevivencia. Los animales se asignaron aleatoriamente a cualquiera de los siguientes grupos:

a) Grupo control. Peritonitis fecal y tratado con solución salina isotónica (SSI). En el tiempo 0 se produjo peritonitis fecal en la forma mencionada, al mismo tiempo los animales recibieron por vía intragástrica (i.g.), 500 uL de SSI y

Cuadro 1. Series experimentales

Serie	Grupos		
I	Control	vs	L-NAME (simultáneo)
II	Control	vs	L-NAME (3 h después)
III	Control	vs	1. L-NIO (3 h después)
			2. Hidrocortisona (2 h antes)
			3. L-NIO + Alopurinol (simultáneo)
			4. Alopurinol (simultáneo)

200 uL de SSI por vía subcutánea (s.c.). El tratamiento se repitió cada 8 horas.

b) Grupo con peritonitis fecal y tratado con alopurinol. En el tiempo 0 se produjo peritonitis fecal en la forma mencionada y al mismo tiempo se administró por vía i.g., alopurinol a razón de 60 mg/kg disuelto en 500 uL de SSI, repitiendo el tratamiento cada 8 horas.

c) Grupo con peritonitis fecal y tratado con L-NAME (tratamiento simultáneo). En el tiempo 0 se produjo peritonitis fecal e inmediatamente después se administró por vía s.c. L-NAME a razón de 5 mg/kg, disueltos en 200 uL de SSI, repitiendo el tratamiento cada 8 horas.

d) Grupo con peritonitis fecal y tratado con L-NAME. En el tiempo 0 se produjo peritonitis fecal en la forma mencionada, 3 horas después se administró por vía s.c. L-NAME a razón de 5 mg/kg, disueltos en 200 uL de SSI, repitiendo el tratamiento cada 8 horas.

e) Grupo con peritonitis fecal y tratado con L-NIO. En el tiempo 0 se produjo peritonitis fecal en la forma mencionada, 3 horas después se administró por vía s.c., L-NIO a razón de 5 mg/kg, disueltos en 200 uL de SSI, repitiendo el tratamiento cada 8 horas.

f) Grupo con peritonitis fecal y tratado con alopurinol y L-NIO. En este grupo se produjo peritonitis fecal en el tiempo 0 y se administró alopurinol y L-NIO en la forma mencionada. El tratamiento se repitió cada 8 horas.

g) Grupo con peritonitis fecal y tratado con hidrocortisona. Dos horas antes del reto se administró por vía i.m., hidrocortisona a razón de 10 mg/kg disueltos en 150 uL de SSI repitiendo el tratamiento cada 8 horas.

Valoración estadística. El tiempo de sobrevivencia se analizó, entre grupos, utilizando el análisis de varianzas múltiples (ANOVA), tomando como nivel de significancia estadística $p < 0.05$. Los resultados se reportaron como la media $\pm$ error estándar de la media (EEM).

Resultados

Grupo control (tratado con el vehículo) vs L-NAME (tratamiento simultáneo al reto).

Se utilizaron 24 ratas y se dividieron aleatoriamente en 2 grupos de 12 cada uno, se les administró L-NAME simultáneo al reto y cada 8 horas, y se comparó con el grupo control, valorándose el tiempo de sobrevivencia en ambas (Cuadro 2). No se obtuvo diferencia significativa en ambos grupos (Figura 1).

Cuadro 2. Sobrevida después del reto

Grupo	Peso (g)	Sobrevida (horas)
Control (n = 12)	258.5 ± 8.66	7.66 ± 0.47
L-NAME (simultáneo al reto, n = 12)	256.41 ± 5.80	7.24 ± 0.50
Media ± EEM		

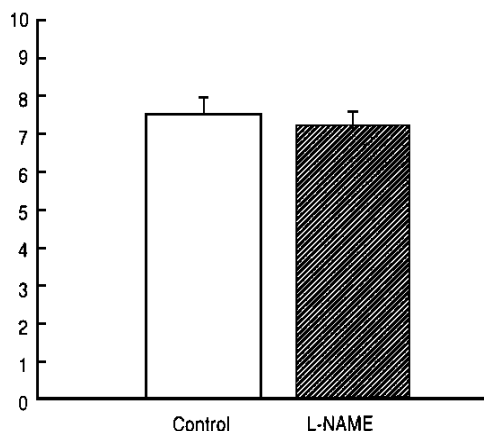


Figura 1. La gráfica muestra la sobrevida en horas del grupo control y del tratado con L-NAME administrado en forma simultánea al reto. No se observa diferencia significativa. Los datos representan la media ± EEM.

Grupo control vs L-NAME (3 horas después).

Se utilizaron 24 ratas y se dividieron aleatoriamente 2 grupos de 12 cada uno; a un grupo se les administró L-NAME 3 horas después del reto a la dosis ya mencionada y se comparó con el grupo control, valorándose la sobrevida en ambas (*Cuadro 3*). El grupo tratado con L-NAME tuvo una sobrevida significativamente menor que el grupo control ($p < 0.01$) (*Figura 2*).

Grupo control vs L-NIO, alopurinol, alopurinol + L-NIO e hidrocortisona.

Se utilizaron 84 ratas y se dividieron aleatoriamente en 5 grupos, el grupo control (n = 24), el grupo tratado con L-NIO (n = 24), el grupo tratado con alopurinol (n = 12), y el grupo tratado con hidrocortisona (n = 12), valorándose el tiempo de sobrevida en todos los grupos (*Cuadro 4*). El grupo tratado con L-NIO tuvo una sobrevida significativamente mayor a la del grupo control ($p = 0.02$). El grupo tratado con alopurinol se comparó con el grupo control, siendo significativamente mayor en el primero ($p = 0.005$). A un siguiente grupo se le administró alopurinol más L-NIO a las dosis ya mencionadas (n = 12), el primero simultáneo con el reto y el segundo 3 horas después del mismo, comparándose el tiempo de sobrevida con el grupo control. No se obtuvo diferencia significativa en ambos grupos (*Figura*

Cuadro 3. Sobrevida después del reto

Grupo	Peso (g)	Sobrevida (horas)
Control (n = 12)	309.75 ± 7.13	9.06 ± 0.54
L-NAME (3 h después del reto, n = 12)	309.66 ± 8.46	7.21 ± 0.20
Media ± EEM		

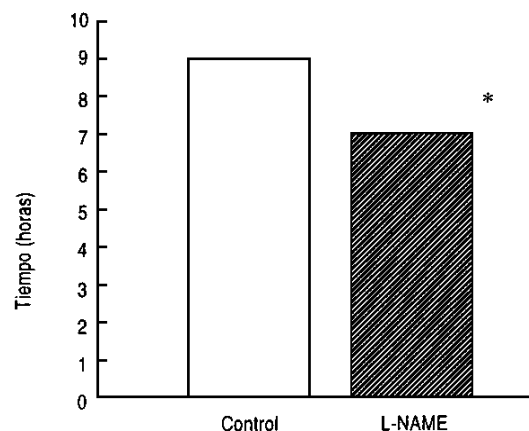


Figura 2. La gráfica muestra el tiempo de sobrevida en horas del grupo control y el tratado con L-NAME administrado 3 horas después del reto. Se observa que en este último grupo la sobrevida fue significativamente menor que en el control. Se representan la media ± EEM.

Cuadro 4. Sobrevida después del reto

Grupo	Peso (g)	Sobrevida (horas)
Control (n = 24)	280.87 ± 10.04	9.53 ± 0.31
L-NIO (3 h después del reto, n = 24)	287.62 ± 8.7	10.81 ± 0.44
Alopurinol (simultáneo al reto, n = 12)	293.33 ± 16.11	11.17 ± 0.47
Alopurinol + L-NIO (Alop. simultáneo, L-NIO 3 h después del reto, n = 12)	256.66 ± 8.37	10.27 ± 0.34
Hidrocortisona (2 h antes del reto, n = 12)	284.33 ± 3.77	12.88 ± 0.52
Media ± EEM		

3). Por último el grupo tratado con hidrocortisona se comparó con el grupo control, y la sobrevida fue significativamente mayor en el primero que en el grupo control ($p <$

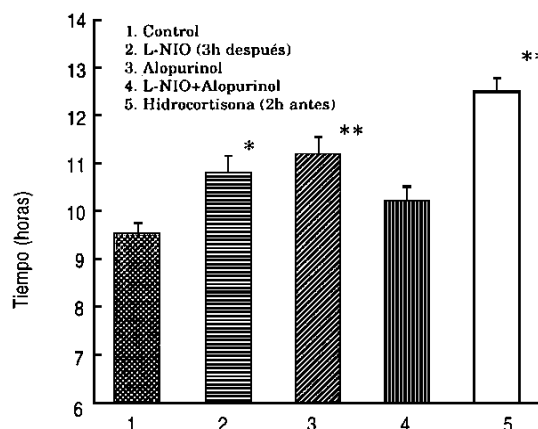
* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Figura 3. La gráfica muestra el tiempo de sobrevida con diferentes tratamientos. Se observa que la sobrevida fue mayor en el grupo tratado con hidrocortisona. Los grupos tratados con L-NIO (3 horas después del reto) y con alopurinol tuvieron sobrevida semejante entre sí, y mayor que la del grupo control. El tratamiento con alopurinol y L-NIO produjo sobrevida semejante al control. Se representan la media $\pm$ EEM.

0.001), así como también fue significativamente mayor que el grupo tratado con alopurinol ($p = 0.02$) y que el tratado con L-NIO ($p = 0.007$) (Figura 3).

Discusión

En este estudio la inyección de materia fecal en peritoneo de rata produjo su muerte de forma inexorable. Dicho modelo es reproducible y los efectos de diversos tratamientos pueden ser cuantificables en términos de tiempo de sobrevida.

En otros estudios se ha demostrado la participación del NO y de los radicales libres en modelos de sepsis en animales,^{8,11} así como la participación de fármacos inhibidores de las sintetasas de NO y de bloqueadores de la formación de radicales libres.¹⁶ En dichos estudios se ha utilizado el LPS o endotoxinas como inductores de choque endotóxico, obteniéndose una mejor sobrevida cuando se utilizan los inhibidores de la sintetasas de NO en la fase descompensada,^{8,11} ya que cuando se utilizan en fases tempranas del choque séptico disminuyen la sobrevida, fenómeno que se postula, se debe a la vasoconstricción producida por el inhibidor que agrava el fenómeno de hipertensión simpática propio de las fases tempranas de choque séptico.¹⁹

En este modelo de peritonitis fecal no se encontró, como en otros estudios, que la administración del L-NAME (inhibidor de las sintetasas de NO, en especial de la constitutiva) disminuyera la sobrevida.¹⁶ Cuando el inhibidor se administró 3 horas después del reto, la sobrevida disminuyó, lo cual difiere en relación a los resultados que se han referido en la literatura, en los que la administración en forma semejante de L-NAME, en grupos inoculados con el LPS produce menor daño y mejora la sobrevida.^{7,16} La diferencia con los resultados del presente trabajo puede deberse a que el modelo

de sepsis es diferente y quizá la administración del L-NAME, 3 horas después del reto, coincida con la fase de hipertensión simpática. Sin embargo el tratamiento con L-NIO 3 horas después del reto, prolongó la sobrevida. Con los resultados del trabajo no podemos explicar las diferencias entre el L-NAME y el L-NIO, las que pudieron deberse a diferencias en la farmacocinética (no se conoce cómo es la de cada uno de ellos), diferencias en la potencia (el L-NIO es más potente que el L-NAME), o diferencias en el efecto que cada uno tiene sobre las sintetasas de NO (el L-NAME actúa preferentemente sobre la enzima constitutiva, mientras que el L-NIO lo hace sobre la inducible).

El alopurinol prolongó la sobrevida, lo que pudo deberse, como se ha reportado en otros modelos de sepsis,¹⁸ a la disminución de la producción de radicales libres. Cuando el alopurinol se combinó con L-NIO el efecto fue menor que el producido por cada uno por separado. Desconocemos si esto se deba a un antagonismo de cualquier tipo entre las drogas.

En el caso de la hidrocortisona los resultados obtenidos en nuestro estudio (mayor sobrevida de todos los grupos), son semejantes a lo obtenido con modelos de LPS.^{4,13} Como en el caso de otros trabajos, el efecto pudo deberse a la inhibición de la inducción de la síntesis de NO, aunque no pueden descartarse otros efectos como es la inhibición de la liberación de citocinas.

Conclusiones

1. Se reprodujo el modelo experimental de peritonitis fecal por administración intraperitoneal de materia fecal.
2. El L-NAME administrado al mismo tiempo del reto, a diferencia de lo reportado en sepsis producida por administración de LPS, no cambió la sobrevida, probablemente debido a que el modelo se comporta de manera diferente.
3. El L-NAME administrado 3 horas después del reto disminuyó la sobrevida, mientras que, en las mismas condiciones el L-NIO la prolongó. Con los resultados del estudio no se explica la diferencia entre los inhibidores. Probablemente esa diferencia sea debida a las características farmacocinéticas de cada inhibidor, a la diferencia en la potencia o al efecto que cada uno ejerce sobre las sintetasas de NO.
4. El alopurinol prolongó la sobrevida, probablemente por disminuir la producción de radicales libres.
5. El efecto del alopurinol combinado con L-NIO fue menor que el que produjo cada uno por separado. Desconocemos si el resultado se debe a antagonismo de algún tipo entre estas drogas.
6. La hidrocortisona fue la que produjo el tiempo de sobrevida más prolongado. En su efecto pudo haber influido, además de la inhibición de la síntesis del NO, la disminución en la liberación de citocinas.

Referencias

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Fein AM, Dellinger RP, Knaus WA et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101: 1644-1655.

2. Buisson CB, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. *JAMA* 1995; 274: 968-974.
3. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-493.
4. Di Rosa M, Radomski M, Carnuccio R, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 1246-1252.
5. Dusting GJ. Nitric oxide in cardiovascular disorders. *J Vasc Res* 1995; 32: 143-611.
6. Glauser MP, Heumann D, Baumgartner JD, Cohen J. Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock: and update. *Clin Infect Dis* 1994; 18(S): S205-S216.
7. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91(S3C): 14S-22S.
8. Hutcheson IR, Whittle VJR, Boughton-Smith NK. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 815-20.
9. Kam PCA, Govender G. Nitric oxide: Basic science and clinical applications. *Anaesthesia* 1994; 49: 515-521.
10. Knaus WA, Sun X, Nystrom PO, Wagner DP. Evaluation of definitions for sepsis. *Chest* 1992; 101: 1656-1662.
11. Laszlo F, Whittle DJR, Moncada S. Time dependent enhancement or inhibition of endotoxin-induced vascular injury in rat intestine by nitric oxide synthase inhibitors. *Br J Pharmacol* 1994; 111: 1309-1315.
12. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-137.
13. Palmer RMJ, Bridge L, Foxwell NA, Moncada S. The role of nitric oxide in endothelial cell damage and its inhibition by glucocorticoid. *Br J Pharmacol* 1992; 105: 11-12.
14. Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Eng J Med* 1993; 328: 1471-1477.
15. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunion RE et al. Septic shock in humans: Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113: 227-242.
16. Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 746-752.
17. Sibbald WJ, Fox G, Martin C. Abnormalities of vascular reactivity in the sepsis syndrome. *Chest* 1991; 100S: 155S-159S.
18. Vaughan W, Horton JW, Walker PB. Allopurinol prevents intestinal permeability changes after ischemia-reperfusion injury. *J Ped Surg* 1992; 27: 968-972.
19. Vlessis AA, Goldman RK, Trunkey DD. New concepts in the pathophysiology of oxygen metabolism during sepsis. *Br J Surg* 1995; 82: 870-876.