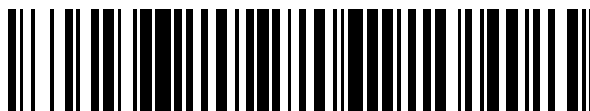


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 188**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2008** **PCT/US2008/063855**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2008** **WO08144481**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2008** **E 08755661 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017** **EP 2147303**

54 Título: **Medición y usos del estado oxidativo**

30 Prioridad:

18.05.2007 US 938925 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.07.2017

73 Titular/es:

AYTU BIOSCIENCE, INC. (100.0%)
373 Inverness Parkway, Suite 206
Englewood, CO 80112, US

72 Inventor/es:

BAR-OR, DAVID y
BAR-OR, RAPHAEL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 627 188 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Medición y usos del estado oxidativo

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método de determinación del estado oxidativo global de un fluido corporal o un tejido de un paciente midiendo el potencial de oxidorreducción (ORP) del fluido corporal o tejido. En particular, la invención se refiere a métodos para el diagnóstico, la evaluación y la monitorización de pacientes que han padecido un traumatismo (tal como un traumatismo craneoencefálico), pacientes que se sospecha que están gravemente enfermos o que están gravemente enfermos, pacientes que tienen una infección vírica, y pacientes que se sospecha que sufren un infarto de miocardio (IM) o que sufren un IM. La invención también se refiere a métodos para la evaluación y la monitorización del rendimiento físico de pacientes. La invención se refiere, además, a métodos para la evaluación y la monitorización de productos sanguíneos almacenados y de pacientes que recibirán dichos productos.

Antecedentes

El estrés oxidativo es causado por una mayor producción de especies reactivas del oxígeno y reactivas del nitrógeno o una disminución de la capacidad antioxidante protectora endógena. El estrés oxidativo se ha relacionado con diversas enfermedades y el envejecimiento, y se ha descubierto que se produce en todo tipo de enfermedades graves. Véase, por ejemplo, Veglia et al., *Biomarkers*, 11(6): 562-573 (2006); Roth et al., *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 7: 161-168 (2004); patente de Estados Unidos N.º 5.290.519 y publicación de patente de Estados Unidos N.º 2005/0142613. Varias investigaciones han demostrado una estrecha asociación entre el estado oxidativo de un paciente gravemente enfermo y el desenlace clínico del paciente. Véase Roth et al., *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 7: 161-168 (2004).

El estrés oxidativo en pacientes ha sido evaluado midiendo diversos marcadores individuales. Véase, por ejemplo, Veglia et al., *Biomarkers*, 11(6): 562-573 (2006); Roth et al., *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 7: 161-168 (2004); patente de Estados Unidos N.º 5.290.519 y publicación de patente de Estados Unidos N.º 2005/0142613. Sin embargo, dichas mediciones a menudo no son fiables y proporcionan mediciones conflictivas y variables del estado oxidativo de un paciente. Véase Veglia et al., *Biomarkers*, 11(6): 562-573 (2006); Roth et al., *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 7: 161-168 (2004). La medición de múltiples marcadores que se usan a continuación para proporcionar una puntuación u otra valoración del estado oxidativo global de un paciente se ha desarrollado para superar los problemas del uso de mediciones de marcadores individuales. Véase Veglia et al., *Biomarkers*, 11(6): 562-573 (2006); Roth et al., *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 7: 161-168 (2004). Aunque dichos enfoques son más fiables y sensibles que las mediciones de un marcador individual, son complejos y requieren tiempo. Por lo tanto, existe una necesidad de un método más sencillo y más rápido para medir de forma fiable el estado oxidativo global de un paciente.

Los siguientes documentos adicionales pueden ser útiles para entender la presente divulgación.

Lemineur T. et al.: "Biomarkers of oxidative stress in critically ill patients; what should be measured, when and now?" *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metabol. Care*, vol. 9. N.º 6, noviembre de 2006, páginas 704-710 describen el estrés oxidativo en pacientes gravemente enfermos con una reacción inflamatoria intensa, para valorar la posible implicación de lesiones oxidativas en sistemas y órganos que frecuentemente fallan en los gravemente enfermos, y confirmando de este modo un papel importante para un mayor estrés oxidativo en las disfunciones agudas de los aparatos respiratorio, renal y cerebral.

Rael L.T. et al.: "Oxidation-reduction potential and paraoxonase-arylesterase activity in trauma patients" *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, vol 361, n.º 2, 21 de septiembre de 2007, páginas 561-565 describe que la cantidad de estrés oxidativo en pacientes con traumatismo grave se basa habitualmente en diversos parámetros individuales tales como antioxidantes totales y peroxidación lipídica. Se describen mediciones sucesivas del potencial de oxidorreducción (ORP) en plasma en pacientes con traumatismo grave como un medio sencillo de valoración del estrés oxidativo global.

Vollaard N.B.J. et al.: "Exercise-induced oxidative stress; myths, realities and physiological relevance." *Sports Med.*, vol 35, n.º 12, 2005, páginas 1045-1062 describe la generación aumentada de radicales libres que acompaña al ejercicio, dando como resultado un grado medible de modificación oxidativa a diversas moléculas e investiga la importancia de las modificaciones oxidativas inducidas por el ejercicio y si éstas inducen daño oxidativo perjudicial, o son una parte integrante de la regulación redox.

Barr-Or D. et al.: "Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use" *Crit. Care Med.*, vol 33, no. 7, 1 de julio de 2005, páginas 1638-1641 describe e investiga el uso de albúmina de suero humano para el tratamiento de choque, restauración aguda del volumen sanguíneo, y en hipoalbuminemia.

El documento US2004238641 desvela un aparato de atención sanitaria, que comprende: una unidad de medición; una unidad de entrada; y una unidad de cálculo del índice de salud. La unidad de medición mide un potencial de oxidación/reducción de un cuerpo de una persona, y dicha unidad de entrada introduce al menos uno de información sobre un organismo vivo diferente de dicho potencial de oxidación/reducción del cuerpo. Además, dicha unidad de cálculo del índice de salud calcula un índice de salud para valorar un estado de salud, basándose en dicho potencial de oxidación/reducción del cuerpo y dicha información sobre un organismo vivo

Rao S.K. et al.: Redox potential measurements of plasma in patients undergoing coronary artery bypass graft and its clinical significance", J. Pharmacol. Toxicol. Meth., vol 38, n.º 3, noviembre de 1997, páginas 151-156, describen la determinación de los potenciales redox aparentes (E_m) de plasma como un marcador de lesión oxidante durante revascularización coronaria (CABG) y su importancia clínica.

Sumario de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico, evaluación o monitorización de un paciente que ha padecido un traumatismo seleccionado entre el grupo que consiste en un traumatismo craneoencefálico, un traumatismo contuso, una fractura ósea y una quemadura, que comprende las siguientes etapas:

medir el potencial de oxidorreducción (ORP) de una muestra de fluido corporal del paciente, seleccionada entre suero o plasma; y realizar una o ambas de las siguientes etapas:

determinar si el ORP es significativamente diferente del ORP del mismo fluido corporal de pacientes normales; y/o si el ORP del fluido corporal del paciente se ha medido al menos una vez antes de la medición actual, determinar si el ORP ha aumentado o disminuido en comparación con la medición o mediciones anteriores.

En algunas realizaciones, el ORP se monitoriza para determinar la eficacia de un tratamiento del paciente.

En algunas realizaciones, el ORP se monitoriza para determinar si el estado del paciente está mejorando o empeorando.

En algunas realizaciones, el ORP se mide una o varias veces al día.

En algunas realizaciones, el traumatismo es un traumatismo craneoencefálico.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico, evaluación o monitorización de un paciente que se sospecha que está gravemente enfermo o de evaluación o monitorización de un paciente al que se le ha diagnosticado que está gravemente enfermo, comprendiendo el método las siguientes etapas:

medir el potencial de oxidorreducción (ORP) de una muestra de fluido corporal del paciente seleccionada entre suero o plasma; y realizar una o ambas de las siguientes etapas:

determinar si el ORP es significativamente diferente del ORP del mismo fluido corporal de pacientes normales; y/o si el ORP del fluido corporal del paciente se ha medido al menos una vez antes de la medición actual, determinar si el ORP ha aumentado o disminuido en comparación con la medición o mediciones anteriores.

En algunas realizaciones, el ORP se usa como parte de una evaluación para determinar si el paciente está o no gravemente enfermo.

En algunas realizaciones, el ORP se monitoriza para determinar la eficacia de un tratamiento del paciente.

En algunas realizaciones, el ORP se monitoriza para determinar si el estado del paciente está mejorando o empeorando.

En algunas realizaciones, el ORP se mide una o varias veces al día.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico, evaluación o monitorización de un paciente que se sospecha que sufre un infarto de miocardio o de evaluación o monitorización de un paciente al que se le ha diagnosticado que sufre un infarto de miocardio, comprendiendo el método las siguientes etapas:

medir el potencial de oxidorreducción (ORP) de una muestra de fluido corporal del paciente seleccionada entre suero o plasma; y realizar una o ambas de las siguientes etapas:

determinar si el ORP es significativamente diferente del ORP del mismo fluido corporal de pacientes normales; y/o
 si el ORP del fluido corporal del paciente se ha medido al menos una vez antes de la medición actual, determinar si el ORP ha aumentado o disminuido en comparación con la medición o mediciones anteriores.

En algunas realizaciones, el ORP se usa como parte de una evaluación para determinar si el paciente está sufriendo o no un infarto de miocardio.

En algunas realizaciones, el ORP se monitoriza para determinar la eficacia de un tratamiento del paciente.

En algunas realizaciones, el ORP se mide una o varias veces al día.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un método de determinación del estado oxidativo global de un fluido corporal de un paciente midiendo el potencial de oxidorreducción (ORP) del fluido corporal. Se ha descubierto que el método es útil en el diagnóstico, la evaluación y la monitorización de pacientes que han padecido un traumatismo (tales como un traumatismo craneoencefálico), pacientes que se sospecha que están gravemente enfermos o a los que se les ha diagnosticado que están gravemente enfermos, and pacientes que se sospecha que sufren un infarto de miocardio (IM) o a los que se les ha diagnosticado que sufren un IM.

Descripción detallada de las

Realizaciones preferidas actualmente de la invención

Tal como se usa en el presente documento, "paciente" significa un mamífero, tal como un perro, gato, caballo, vaca o ser humano. De la forma más preferente, el paciente es un ser humano.

Los fluidos corporales adecuados incluyen plasma o suero.

Para traumatismos craneoencefálicos, el fluido corporal es, de la forma más preferente, plasma. En casos diferentes de traumatismos craneoencefálicos, el fluido corporal es, de la forma más preferente, plasma.

Tal como se usa en el presente documento, "normal," "paciente normal" o "control" significa un mamífero de la misma especie que el paciente (por ejemplo, el normal será un ser humano cuando el paciente es un ser humano), y que no padece ninguna enfermedad. Dado que el ORP aumenta con la edad, los normales deben ser de la misma edad o intervalo de edad que el o los pacientes que son ensayados.

Un sistema de oxidorreducción, o sistema redox, implica la transferencia de electrones desde un reductor a un oxidante de acuerdo con la siguiente ecuación:



donde $n e^{-}$ es igual al número de electrones transferidos. En equilibrio, el potencial redox (E), o potencial de oxidorreducción (ORP), se calcula de acuerdo con la ecuación de Nernst-Peters:

$$E(\text{ORP}) = E_0 - RT/nF \ln [\text{reductor}]/[\text{oxidante}] \quad (2)$$

donde R (constante de los gases), T (temperatura en grados Kelvin) y F (constante de Faraday) son constantes. E_0 es el potencial estándar de un sistema redox medido con respecto a un electrodo de hidrógeno, al que se le asigna arbitrariamente un E_0 de 0 voltios, y n es el número de electrones transferidos. Por lo tanto, el ORP depende de las concentraciones totales de reductores y oxidantes, y el ORP es una medida integrada del equilibrio entre oxidantes y reductores totales en un sistema particular. Por lo tanto, el ORP proporciona una medición del estado oxidativo global de un fluido corporal o tejido de un paciente.

Una medición del ORP que es significativamente mayor que el de normales indicará la presencia de estrés oxidativo. El estrés oxidativo se ha relacionado con muchas enfermedades, y se ha descubierto que se produce en todos los tipos de enfermedades graves. Por consiguiente, un nivel de ORP significativamente mayor que el de los normales indica la presencia de una enfermedad y quizás una enfermedad grave. Una medición del ORP que es igual o menor que la de los normales indica la ausencia de estrés oxidativo y la ausencia de una enfermedad o enfermedad grave. Por lo tanto, el nivel de ORP de un paciente puede ser usado por un médico o veterinario como ayuda en para diagnosticar o descartar la presencia de una enfermedad, particularmente una enfermedad grave. Se pueden usar mediciones secuenciales de ORP a lo largo del tiempo para monitorizar la evolución de una enfermedad y la eficacia o falta de eficacia del tratamiento de la enfermedad. Si el ORP de un paciente no disminuye después del tratamiento, o especialmente si aumenta a pesar del tratamiento, esto puede indicar un mal pronóstico y la necesidad de tratamientos más agresivos y/o adicionales y/o diferentes. En el caso de una medición realizada por un paciente, tal

como un paciente que experimenta síntomas de infarto de miocardio, el nivel de ORP puede indicar la necesidad de que el paciente acuda a un médico o que pase inmediatamente a una sala de urgencias para tratamiento.

El ORP de un fluido corporal puede medirse fácilmente poniendo en contacto un electrodo de ORP o redox con el fluido corporal o tejido. Dichos electrodos están disponibles en el mercado de, por ejemplo, Microelectrodes, Inc., Bedford, NH. Dichos electrodos pueden adolecer de variabilidad de un día a otro, y será necesario el uso de patrones de referencia. Los patrones de referencia adecuados incluyen quinhidrona saturada a varios pH. El electrodo se conecta a un medidor que proporciona una lectura del ORP en milivoltios y, opcionalmente, otros parámetros, tales como pH y temperatura. Dichos medidores están disponibles en el mercado de, por ejemplo, Hanna Instruments, Woonsocket, RI.

Se ha descubierto que el método de la invención es útil en el diagnóstico, la evaluación y la monitorización de pacientes que están padeciendo, o que se sospecha que padecen, ciertas enfermedades. El ORP puede usarse, en combinación con los antecedentes médicos, síntomas y resultados de otros ensayos, como una ayuda para diagnosticar, evaluar y monitorizar estas enfermedades y tratamientos de las mismas. En particular, un ORP normal puede ser útil para descartar la presencia de una enfermedad, particularmente una enfermedad grave, y para ahorrar recursos médicos que, en caso contrario, se destinarían a tratar pacientes innecesariamente. Además, un ORP significativamente alto (que indica estrés oxidativo) puede usarse para identificar aquellos pacientes que necesitan tratamiento inmediato o más agresivo de su enfermedad y/o tratamiento para reducir el estrés oxidativo.

Un ORP que es significativamente alto en comparación con los normales puede indicar la necesidad o deseabilidad de realizar ensayos para uno o más marcadores individuales de estrés oxidativo para entender mejor la razón o fuente de, y por lo tanto el mejor tratamiento para, el estrés oxidativo o la enfermedad. Por lo tanto, la invención también incluye el uso de ORP en combinación con ensayos para uno o más marcadores individuales de estrés oxidativo (denominados colectivamente en el presente documento un "panel de ensayos de estrés oxidativo"). Dichos marcadores de estrés oxidativo y métodos de medición de los mismos se conocen. Véase, por ejemplo, Veglia, et al., *Biomarkers*, 11(6): 562-573 (2006); Rana et al., *Mol. Cell Biochem.*, 291: 161-166 (2006); Roth et al., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 7: 161-168 (2004); Horton, *Toxicology*, 189: 75-88 (2003); Winterbourn et al., *Crit. Care Med.*, 28: 143-149 (2000); Ghiselli et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 29(11): 1106-1114 (2000); Rice-Evans, *Free Radic. Res.*, 33 Supl.: S59-S66 (2000); Prior and Cao, *Free Radic. Biol. Med.*, 27(11-12): 1173-1181 (1999); Galley et al., *Crit. Care Med.*, 24: 1649-53 (1996); Goode et al., *Crit. Care Med.*, 23: 646-651 (1995).

La lesión por traumatismo es una causa principal de muerte e incapacidad para todos los grupos de edad por debajo de 60 años de edad. En los Estados Unidos, las lesiones por traumatismo suponen más de 160.000 muertes cada año y millones de lesiones que permiten mayor supervivencia. Para muchas personas, la lesión causa dolor e incomodidad temporales. Para otras, la lesión provoca sufrimiento, incapacidad, dolor crónico y un profundo cambio de la calidad de vida, incluyendo consecuencias económicas sustanciales. Los costes económicos de las lesiones por traumatismo incluyen los costes asociados con el tratamiento médico así como costes en productividad perdida. Solo en el 2000, los 50 millones de lesiones que requirieron tratamiento médico costaron, en última instancia, 406 mil millones de dólares. Esto incluye estimaciones de 80,2 mil millones de dólares en costes de atención médica medical y 326 mil millones de dólares en pérdidas de productividad.

Se ha descubierto que el método de la presente invención es útil en el diagnóstico, la evaluación y la monitorización de pacientes que han padecido un traumatismo. Tal como se usa en el presente documento, "traumatismo" se refiere a una lesión física de cualquier parte del cuerpo de un paciente o a múltiples partes del cuerpo de un paciente. Las lesiones por traumatismo incluyen traumatismos craneoencefálicos, lesiones internas, traumatismos contusos, traumatismo múltiple, fracturas óseas y quemaduras.

La presente invención proporciona un medio para la determinación y la monitorización del estado oxidativo de pacientes con traumatismo y proporciona a los médicos y veterinarios información en tiempo real para guiar el tratamiento y la atención de traumatismos. En particular, la existencia y el grado de estrés oxidativo en pacientes con traumatismo pueden determinarse y monitorizarse. Por ejemplo, un nivel de ORP que es estadísticamente igual que, o menor que, el de los normales en el momento de la primera exploración de un paciente con traumatismo (por ejemplo, por un paramédico in situ o por un médico en una sala de urgencias) indica que el estrés oxidativo no está presente y que el paciente puede no necesitar tratamiento agresivo o ni tan siquiera puede necesitar ser ingresado en un hospital. De esta manera, se pueden ahorrar recursos médicos y rebajar costes. Por otro lado, un nivel de ORP significativamente mayor que el de los normales en el momento de la primera exploración de un paciente con traumatismo indica la presencia de estrés oxidativo y la necesidad de tratamiento inmediato del paciente y de monitorización continua del ORP del paciente. Cuanto mayor sea el nivel de ORP, mayor será el nivel de estrés oxidativo, y mayor será la necesidad de tratamiento agresivo del paciente. Un nivel de ORP que disminuye con el tratamiento indica que el paciente está mejorando y que el tratamiento está funcionando. Un nivel de ORP que aumenta a pesar del tratamiento indica que el paciente está empeorando y que es necesario un tratamiento más agresivo, tratamiento adicional y/o un tratamiento diferente. Un nivel de ORP que ha disminuido hasta el punto en el que ya no es significativamente más alto que el de los normales indica que el paciente puede recibir el alta hospitalaria. Por supuesto, el nivel de ORP es solamente un parámetro de diagnóstico, y debe usarse en

combinación con otros síntomas, resultados de una exploración física, antecedentes médicos, y los resultados de otros ensayos de laboratorio, para determinar el tratamiento apropiado para un paciente con traumatismo.

La presente divulgación describe además el diagnóstico, la evaluación y la monitorización de pacientes que presentan una infección vírica. Las infecciones víricas incluyen infecciones causadas por el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus de la encefalitis, virus de la hepatitis, virus de la gripe, el virus de la neumonía y otros virus que causan enfermedades víricas graves.

En un paciente que padece una enfermedad vírica, un nivel de ORP que es estadísticamente igual que, o menor que, el de los normales en el momento de la exploración de dicho paciente indica que el estrés oxidativo no está presente y que el paciente puede necesitar solamente tratamientos estándar. Por otro lado, un nivel de ORP significativamente mayor que el de los normales en el momento de una exploración de un paciente indica la presencia de estrés oxidativo y la necesidad de tratamiento más agresivo del paciente, incluyendo posiblemente ingreso en el hospital, y de monitorización continua del ORP del paciente. Cuanto mayor sea el nivel de ORP, mayor será el nivel de estrés oxidativo, y mayor será la necesidad de tratamiento agresivo del paciente. Un nivel de ORP que disminuye con el tratamiento indica que el paciente está mejorando y que el tratamiento está funcionando. Un nivel de ORP que aumenta a pesar del tratamiento indica que el paciente está empeorando y que es necesario un tratamiento más agresivo, tratamiento adicional y/o un tratamiento diferente. Un nivel de ORP que ha disminuido hasta el punto en el que ya no es significativamente más alto que el de los normales indica que el tratamiento agresivo del paciente puede interrumpirse, incluyendo el alta hospitalaria del paciente. Por supuesto, el nivel de ORP es solamente un parámetro de diagnóstico, y debe usarse en combinación con otros síntomas, resultados de una exploración física, antecedentes médicos, y los resultados de otros ensayos de laboratorio, para determinar el tratamiento apropiado para un paciente que presenta una infección vírica.

Cada año en los Estados Unidos, aproximadamente 6-8 millones de personas se presentan en la sala de urgencias (SU) de un hospital con dolor torácico u otros síntomas cardíacos (por ejemplo, respiración entrecortada y dolor u hormigueo en el brazo izquierdo). Desafortunadamente, aproximadamente el 2-5 % de los 3-4 millones que son enviados a casa desde la SU reciben un diagnóstico erróneo. Los errores de diagnóstico de dolor torácico son la causa principal de las indemnizaciones por mala praxis de medicina de urgencias. De los otros 3-4 millones que son hospitalizados, aproximadamente el 60-75 % no padecen una cardiopatía. El coste mínimo para cada paciente hospitalizado es de 3.000-5.000 dólares, lo que significa que más de 6 millones de dólares en atención sanitaria son malgastados cada año debido a estas hospitalizaciones innecesarias. Con un electrocardiograma (ECG) no diagnóstico, no existen biomarcadores tempranos fiables. Los niveles de troponina I o troponina T no son fiables durante las primeras 6-24 horas después de la aparición de los síntomas debido a baja sensibilidad, y las isoenzimas de creatina quinasa (CK-MB) y la mioglobina no son específicas cardíacas. Sería altamente deseable contar con un resultado de ensayo de laboratorio que pudiera ayudar en el diagnóstico de infarto de miocardio o descartarlo.

El método de la invención proporciona dicho resultado de ensayo y se ha descubierto que es útil en el diagnóstico, la evaluación y la monitorización de pacientes que se sospecha que sufren un infarto de miocardio (IM). El método de la presente invención es particularmente para el diagnóstico temprano de IM. Por "diagnóstico temprano" se entiende valorar la presencia o ausencia de IM durante las primeras pocas horas (menos de 24 horas, especialmente menos de 12 horas) después de la aparición de síntomas indicativos de IM, tales como dolor torácico, respiración entrecortada y dolor u hormigueo en el brazo izquierdo. También se ha descubierto que el método de la invención es útil en la evaluación y monitorización de pacientes a los que se les ha diagnosticado un IM.

En particular, la existencia y el grado de estrés oxidativo en pacientes que se presentan con síntomas de IM puede determinarse y monitorizarse de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, un nivel de ORP que es estadísticamente igual que, o menor que, el de los normales en el momento de la primera exploración de un paciente que se sospecha que sufre un IM (por ejemplo, por un paramédico in situ o por un médico en una sala de urgencias) indica que el estrés oxidativo no está presente y que el paciente no está sufriendo un IM. En tal caso, el paciente puede no necesitar tratamiento y puede no necesitar que lo mantengan en una SU o lo ingresen en el hospital. De esta manera, pueden ahorrarse recursos médicos y rebajarse costes. Por otro lado, un nivel de ORP significativamente mayor que el de los normales en el momento de la primera exploración de un paciente del que se sospecha que sufre un IM indica la presencia de estrés oxidativo y que el paciente puede estar sufriendo un IM. Dicho nivel de ORP indica la necesidad de tratamiento inmediato del paciente y monitorización continua del ORP del paciente. Cuanto mayor sea el nivel de ORP, mayor será el nivel de estrés oxidativo, y mayor será la necesidad de tratamiento agresivo del paciente. Un nivel de ORP que disminuye con el tratamiento indica que el paciente está mejorando y que el tratamiento está funcionando. Un nivel de ORP que aumenta a pesar del tratamiento indica que el paciente está empeorando y que es necesario un tratamiento más agresivo, tratamiento adicional y/o un tratamiento diferente. Un nivel de ORP que ha disminuido hasta el punto en el que ya no es significativamente más alto que el de los normales indica que el paciente puede recibir el alta hospitalaria. Por supuesto, el nivel de ORP es solamente un parámetro de diagnóstico, y debe usarse en combinación con otros síntomas, resultados de una exploración física, antecedentes médicos y los resultados de otros ensayos de laboratorio, para determinar el tratamiento apropiado para un paciente que se sospecha que sufre un IM o un paciente al que se le ha diagnosticado que realmente sufre un IM.

También se ha descubierto que el método de la invención es útil en el diagnóstico, la evaluación y la monitorización de pacientes que se sospecha que están gravemente enfermos y la evaluación y la monitorización de pacientes que se ha descubierto que están gravemente enfermos. Es bien conocido que la presencia de estrés oxidativo en pacientes gravemente enfermos está correlacionada positivamente con desenlaces clínicos malos. Véase Roth et al., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 7: 161-168 (2004). Por consiguiente, el ORP de pacientes que están, que se sospecha que están, o que es probable que se vuelvan, gravemente enfermos debe monitorizarse. Un nivel de ORP de un paciente que es estadísticamente igual que, o menor que, el de los normales indica que el estrés oxidativo no está presente y que el paciente no está gravemente enfermo. Dicho nivel de ORP indica que no es necesario tratamiento agresivo del paciente. Un nivel de ORP que es significativamente mayor que el de los normales indica la presencia de estrés oxidativo y que el paciente está gravemente enfermo. Dicho nivel de ORP indica la necesidad de tratamiento agresivo del paciente y de monitorización continua del ORP del paciente. Cuanto mayor sea el nivel de ORP, mayor será el nivel de estrés oxidativo, y mayor será la necesidad de tratamiento agresivo del paciente. Un nivel de ORP que disminuye con el tratamiento indica que el paciente está mejorando y que el tratamiento está funcionando. Un nivel de ORP que aumenta a pesar del tratamiento indica que el paciente está empeorando y que es necesario un tratamiento más agresivo, tratamiento adicional y/o un tratamiento diferente. Un nivel de ORP que ha disminuido hasta el punto en el que ya no es significativamente más alto que el de los normales indica que el paciente ya no está gravemente enfermo y puede recibir el alta hospitalaria. Por supuesto, el nivel de ORP es solamente un parámetro de diagnóstico, y debe usarse en combinación con otros síntomas, resultados de una exploración física, antecedentes médicos, y los resultados de otros ensayos de laboratorio, para determinar el tratamiento apropiado para un paciente.

El uso de productos sanguíneos almacenados en bancos es una práctica común empleada por la comunidad médica en todo el mundo por razones beneficiosas obvias. Sin embargo, existe un riesgo de efectos secundarios adversos a partir de la transfusión de productos sanguíneos al interior de pacientes, incluyendo el posible desarrollo de lesión pulmonar aguda postransfusional (TRALI), fallo multiorgánico (MOF), y síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS). Brittingham et al., *J. Am. Med. Assoc.*, 165: 819-825 (1957); Sauaia et al., *Arch. Surg.*, 129: 39-45 (1994); Miller et al., *Am. Surg.*, 68: 845-850 (2002). Sería deseable contar con un medio para evitar o reducir estos efectos secundarios.

La presente divulgación describe, además, la monitorización y la evaluación de productos sanguíneos almacenados (en bancos). Los productos sanguíneos que pueden monitorizarse y evaluarse incluyen sangre completa, glóbulos rojos concentrados, plaquetas y plasma recién congelado. En particular, se ha descubierto que el ORP de productos sanguíneos almacenados aumenta con el tiempo de almacenamiento. Por ejemplo, los glóbulos rojos concentrados tienen un ORP aumentado significativamente el día 42 en comparación con el día 1. Un ORP aumentado indica un nivel aumentado de oxidantes en el producto sanguíneo, y el nivel aumentado de oxidantes puede contribuir al desarrollo de efectos secundarios en pacientes que reciben el producto sanguíneo, dado que se esperaría que la transfusión de dicho producto sanguíneo aumente el nivel de oxidantes y el estrés oxidativo en el paciente.

La presente divulgación describe, además, la monitorización y la evaluación de pacientes que recibirán productos sanguíneos almacenados. En particular, un nivel de ORP en dicho paciente que es significativamente mayor que el de los normales indica la presencia de estrés oxidativo, y dicho paciente no debe recibir una transfusión o debe recibir una transfusión con productos sanguíneos que contienen niveles más bajos de especies oxidantes (es decir, un producto sanguíneo que tiene un nivel de ORP más bajo, preferentemente igual que el de un producto sanguíneo fresco). El nivel de ORP de un producto sanguíneo puede ser menos crítico para pacientes que tienen un nivel de ORP que es estadísticamente igual que, o menor que, el de los normales, dado que dicho nivel indica que el estrés oxidativo no está presente. Determinar el estado oxidativo del paciente y del producto sanguíneo debe dar como resultado una disminución de efectos secundarios relacionados con la transfusión.

El ejercicio está asociado con un metabolismo aerobio y/o anaerobio potenciado que da como resultado una mayor formación de especies reactivas del oxígeno (ERO). El ejercicio extenuante, el exceso de ejercicio y el sobreentrenamiento generan ERO a un nivel que puede abrumar los sistemas de defensa antioxidante. Véase Sen, *Sports Med.*, 31: 891-908 (2001); Margonis et al., *Free Radical Biol. Med.*, 43(6): 901-910 (15 de septiembre de 2007); Gomez-Cabrera et al., *Free Radical Biol. Med.*, 44(2): 126-131 (2008); Radak et al., *Ageing Res. Rev.*, 7(1): 34-42 (2008). El resultado es estrés oxidativo, y el estrés oxidativo puede causar extenso daño molecular, celular y tisular. Un posible desenlace clínico es el daño oxidativo a tejidos musculares. Prevenir o reducir el daño al tejido muscular durante el entrenamiento físico debe ayudar a optimizar el efecto del entrenamiento y el eventual rendimiento. El ejercicio regular de intensidad y duración moderadas, aunque genera ERO, también induce una mejora de las enzimas y proteínas antioxidantes naturales y la regulación positiva de sistemas de defensa antioxidante. Véase Ji, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 222: 283-292 (1999); Rahnama et al., *J. Sports Med Phys. Fitness*, 47: 119-123 (2007); Gomez-Cabrera et al., *Free Radical Biol. Med.*, 44(2): 126-131 (2008); Ji, *Free Radical Biol. Med.*, 44: 142-152 (2008); Radak et al., *Ageing Res. Rev.*, 7(1): 34-42 (2008). Estas adaptaciones dan como resultado una menor exposición oxidativa al cuerpo y el mantenimiento de la homeostasis oxidante-antioxidante. Además, parece que la modulación inducida por el ejercicio del estado redox es un medio importante mediante el cual el ejercicio beneficia al organismo, aumentando la resistencia contra, y facilitando la recuperación de, estrés oxidativo. Radak et al., *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 32: 942-946 (2007); Radak et al., *Free Radical Biol. Med.*, 44: 153-

159 (2008). A partir de lo anterior, puede verse que los beneficios máximos del ejercicio pueden alcanzarse a partir de un ejercicio que no causa estrés oxidativo, y que el ejercicio que causa estrés oxidativo debe evitarse, cuando sea posible.

La presente divulgación describe, además, la monitorización y la evaluación del rendimiento físico en pacientes. Se mide el ORP de pacientes antes y después, antes y durante, o antes, durante y después del ejercicio. Un nivel de ORP de un paciente durante o después del ejercicio que es estadísticamente igual que, o menor que, el del paciente antes del ejercicio indica que el estrés oxidativo no está presente. Dicho nivel de ORP indica que no es necesario cambiar el ejercicio. Un nivel de ORP de un paciente durante o después del ejercicio que es significativamente mayor que el del paciente antes del ejercicio indica la presencia de estrés oxidativo. Dicho nivel de ORP indica que el ejercicio puede estar causando daño y debe cambiarse de alguna manera, tal como cambiando la frecuencia del ejercicio, la duración del ejercicio o incluso el tipo de ejercicio. Tal como puede verse, la monitorización del ORP de un paciente puede dar como resultado el diseño de un programa de ejercicio óptimo para el paciente, de modo que el paciente pueda conseguir sus metas de bienestar físico deseadas sin experimentar los efectos adversos y el daño causados por el estrés oxidativo.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Diagnóstico de infarto agudo de miocardio

Se recogió sangre completa de sujetos normales y pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) mediante venopunción usando un Vacutainer™ que contiene heparina sódica (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). El plasma se dividió en alícuotas en cantidades de 1 ml y se almacenó a -80 °C para uso futuro.

Las mediciones del potencial de oxidorreducción (ORP) se registraron usando un micro Electrodo Redox MI-800/410 cm de combinación de Pt/AgCl (Microelectrodes, Inc., Bedford, NH, EE. UU.) conectado a un medidor de mesa de pH/mV/temperatura HI4222 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EE. UU.). El electrodo se sumergió en una muestra de plasma, y se registró una lectura de ORP en situación de equilibrio en milivoltios (mV).

Los resultados se presentan en la tabla 1 a continuación. Los datos se analizaron usando prueba t de Student de dos colas suponiendo varianzas no uniformes. Tal como puede verse a partir de la tabla 1, el ORP de los plasmas de pacientes con IAM era significativamente diferente del de los plasmas de los normales. Por lo tanto, una medición del ORP del plasma puede usarse como ayuda para distinguir pacientes que están experimentando realmente un IAM de aquellos cuyos síntomas similares a IAM son debido a otra causa.

TABLA 1

Plasmas de IAM	
<i>N.º de muestra</i>	<i>ORP</i>
GR-358	-24,5
GR-379	-30,5
GR-397	-34,0
GR-1266-05	-15,0
GR-1328	-4,1
GR-1435-02	-11,7
Media:	-20,0
SD:	11,6
Normal Plasmas	
<i>N.º de muestra</i>	<i>ORP</i>
GR-1347-02	-41,7
GR-1425	-65,3
GR-1426	-52,6
GR-1427	-52,7
GR-1428	-59,2
GR-1429	-55,3
GR-1430	-53,2
GR-1431	-58,4
GR-1432	-30,6

Normal Plasmas	
N.º de muestra	ORP
GR-1433	-50,9
Media:	-52,0
SD:	9,7
Comparación de muestras de IAM con muestras normales	
Valor p	0,0003

EJEMPLO 2: Monitorización e identificación de pacientes con traumatismo gravemente enfermos

- 5 El potencial de oxidorreducción (ORP) en un sistema biológico es una medida integrada del equilibrio entre los componentes pro- y antioxidantes totales del sistema. En el plasma, muchos constituyentes contribuyen al ORP. Las especies reactivas del oxígeno (ERO), tales como el ion superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, peroxinitrito, iones de metales de transición, y ácido hipocloroso, contribuyen al potencial oxidativo. Los antioxidantes del plasma incluyen tioles, vitamina C, tocoferol, β -caroteno, licopeno, ácido úrico, bilirrubina, y flavinoides. Enzimas, tales como SOD, catalasa, y glutatión peroxidasa, están implicadas en la conversión de ERO en especies menos reactivas. La monitorización del ORP de plasma proporciona una medición individual que integra el equilibrio cuantitativo global entre los componentes pro- y antioxidantes del sistema, y el nivel de ORP es un indicador del estado oxidativo global de un paciente.
- 10
- 15 Los pacientes gravemente enfermos padecen estrés oxidativo, lo que refleja un desequilibrio en favor de los componentes pro-oxidantes en los entornos intra- y extracelular. Las consecuencias biológicas de este desequilibrio favorecen ciertas reacciones químicas que podrían ser tanto beneficiosas como perjudiciales para el sistema dependiendo del sistema implicado y el proceso de enfermedad. Intentos previos de valorar el estado redox de pacientes gravemente enfermos se han limitado a mediciones de parámetros individuales, tales como concentraciones de antioxidantes individuales (Goode et al., Crit. Care Med., 23: 646-51 (1995)) o la cantidad de peroxidación de lípidos (Rana et al., Mol. Cell Biochem., 291: 161-6 (2006)). Aunque estos parámetros podrían ser útiles, podrían no proporcionar al facultativo una valoración completa de la cantidad de estrés oxidativo que se produce en un paciente gravemente enfermo. Adicionalmente, la medición de estos diversos parámetros demostraría ser laboriosa, requerir tiempo, y, por lo tanto, ser impráctica en el entorno clínico. En este contexto, se describe un método que mide el estado oxidativo global de pacientes con traumatismo gravemente enfermos usando un electrodo que mide el ORP en el plasma de los pacientes posiblemente en tiempo real.
- 20
- 25

Materiales y métodos

- 30 Este estudio recibió la aprobación de la Junta de Revisión Institucional de HCA-HealthOne de acuerdo con las directrices publicadas por la Oficina para la protección de los seres humanos en la investigación (HHS Office for Protection from Research Risk). Se recogió sangre de sujetos normales (N = 10) y pacientes gravemente enfermos que habían padecido traumatismos graves (N = 39) mediante venopunción usando un Vacutainer™ que contenía heparina sódica (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). Para pacientes gravemente enfermos, la sangre se recogió casi a diario hasta el alta. El plasma se dividió en alícuotas en cantidades de 1 ml y se almacenó a -80 °C para uso futuro. Las demografías de pacientes se enumeran en la tabla 2.
- 35

TABLA 2

	Pacientes	Controles
Número (n)	39	10
Edad	43,8 años \pm 2,7 SEM	46,4 años \pm 3,5 SEM
Sexo	31 varones	7 varones
	8 mujeres	3 mujeres
Puntuación de gravedad de la lesión (ISS)	30,7 \pm 2,4 SEM	N/A

- 40 Las mediciones del potencial de oxidorreducción (ORP) se registraron a temperatura ambiente usando un micro Electrodo Redox MI-800/410 cm de combinación de Pt/AgCl (Microelectrodes, Inc., Bedford, NH, EE. UU.) conectado a un medidor de mesa de pH/mV/temperatura HI4222 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EE. UU.). Las muestras de plasma se descongelaron, y el electrodo de ORP se sumergió en el plasma. Se registró una lectura en milivoltios (mV) después de que el valor de ORP fue estable durante 5 segundos.
- 45

La proteína total se cuantificó en todas las muestras de plasma usando el ensayo de proteínas con ácido bicinconínico (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE. UU.). Todas las muestras de plasma se diluyeron 1:100 con 1X solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, antes de la aplicación a una placa de 96 pocillos. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

La paraoxonasa (PON) es una aril esterasa (AE) dependiente de calcio presente en el plasma. Cuando la PON se asocia con lipoproteínas de alta densidad (HDL), se ha observado un efecto antioxidante contra la peroxidación de lípidos (Ferretti et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1635: 48-54 (2003)). De hecho, una menor actividad de PON se ha asociado con una mayor susceptibilidad de HDL a la peroxidación en pacientes afectados por enfermedades caracterizadas por aumentos del daño oxidativo (Ferretti et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89: 2957-2962 (2004); Ferretti et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90: 1728-1733 (2005)).

La actividad de PON-AE en plasma se midió tal como se ha descrito anteriormente. Ahmed et al., *J. Biol. Chem.*, 280: 5724-5732 (2005). En resumen, se diluyó plasma a 1:20 con 1X solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. El plasma diluido se combinó a continuación 1:1 con *para*-nitrofenolacetato 4 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en una placa de 96 pocillos por duplicado. La placa se leyó inmediatamente en un lector de placas pre-calentado (37 °C) (FL600 Microplate Fluorescence Reader, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT) ajustado a 410 nm. Se tomaron lecturas de absorbancia cada 2 minutos durante 20 minutos. La pendiente de la parte lineal del gráfico cinético ($R^2 \geq 0,99$) se usó para generar actividad de PON-AE. La actividad de PON-AE se normalizó respecto a proteína del plasma. La actividad de PON-AE se indica en unidades (U), donde una unidad es igual al cambio en unidades de mili-absorbancia a 410 nm por minuto por mg de proteína en plasma total.

Los datos de ORP, PON-AE y proteína total se analizaron usando Matlab R14 (Mathworks, Natick, MA). Se usó una ANOVA de una vía para comparar todos los datos de pacientes frente a datos normales para ensayar para diferencias significativas con una corrección de Tukey-Kramer para múltiples comparaciones con un nivel de significación de 0,05. Todos los datos se indican como \pm error estándar de la media (SEM).

Resultados y conclusiones

Se recogió plasma de pacientes gravemente enfermos que habían sufrido varios traumatismos desde el momento del ingreso hasta el alta. El ORP se midió en la serie completa de muestras de plasma recogidas de un paciente particular después de que el paciente recibió el alta con el fin de limitar cualquier variabilidad de un día para otro en el electrodo de ORP.

Se observó un rápido aumento de ORP para todos los pacientes después de una lectura de ORP inicial de -19,9 mV ($\pm 3,0$ SEM) en el ingreso. El valor de ORP en el ingreso es significativamente mayor que el de plasmas normales (-52,0 mV $\pm 3,1$ SEM, $p < 0,05$). El máximo de ORP, alcanzado el día 6 ($\pm 0,5$ SEM), era significativamente más alto que el valor en el ingreso, con un valor de + 13,7 mV ($\pm 2,5$ SEM). El máximo de ORP también era significativamente mayor que los plasmas normales (-52,0 mV $\pm 3,1$ SEM, $p < 0,05$). Durante el resto del ciclo de hospitalización, el ORP del plasma de estos pacientes con traumatismo grave se acercó de forma constante al ORP de normal plasma. En el momento del alta, el ORP de plasma obtenido de los pacientes con traumatismo grave no fue significativamente diferente al del plasma normal (-52,0 mV $\pm 3,1$ SEM).

Para fines de validación del método, se midieron las actividades de PON-AE y los niveles de proteína total. Las actividades de PON-AE eran significativamente más altas en las muestras del ingreso (740,0 U/mg de proteína $\pm 20,2$ SEM) en comparación con las muestras de máximos de ORP (649,1 U/mg de proteína $\pm 18,8$ SEM). Por lo tanto, los resultados muestran una correlación entre traumatismo y una disminución de la actividad de PON-AE. De forma similar, los niveles de proteínas fueron mayores en las muestras del ingreso (47,3 mg/ml $\pm 1,6$ SEM) en comparación con las muestras de máximos de ORP (41,6 $\pm 1,3$ SEM).

La presencia de marcadores de estrés oxidativo en pacientes gravemente enfermos está asociada con un mal pronóstico (Roth et al., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 7: 161-8 (2004)). Sin embargo, ningún parámetro individual puede predecir de forma precisa el estado redox global para un paciente gravemente enfermo. La laboriosa realización de múltiples ensayos para la cuantificación de pro-oxidantes y antioxidantes no es práctica en un entorno clínico. Por lo tanto, se justifica un ensayo de diagnóstico rápido y sencillo.

En este contexto, el potencial de oxidorreducción (ORP) de plasma recogido en días consecutivos de pacientes con traumatismo, gravemente enfermos se midió a partir del ingreso en el hospital hasta el momento del alta. Diariamente, los niveles de ORP se correlacionaban con acontecimientos clínicos registrados en los historiales médicos de cada paciente particular, con aumentos de ORP que indican un empeoramiento del estado de un paciente y disminuciones de ORP que indican una mejora del estado de un paciente. Por consiguiente, la monitorización del ORP debe ser una herramienta útil para valorar y monitorizar la presencia y el grado de estrés oxidativo, la gravedad de una lesión, el pronóstico de un paciente, y la eficacia de uno o más tratamientos. La monitorización del ORP podría usarse para determinar las condiciones clínicas apropiadas y la temporización que garantizan el tratamiento (por ejemplo, administración de antioxidantes) de pacientes con traumatismo. En particular, podría usarse monitorización de ORP para ayudar a la identificación de pacientes que están gravemente enfermos y

aquellos que necesitan un tratamiento más agresivo que puede estar indicado por sus síntomas y otros resultados de ensayo de diagnóstico.

EJEMPLO 3: ORP de plasmas antes y después del ejercicio

El propósito de este experimento era determinar si el ejercicio tenía un efecto sobre el potencial de oxidorreducción (ORP) en plasma. Se recogió sangre completa de miembros de un equipo de fútbol escolar femenino antes y después del ejercicio. El ejercicio consistía en un intenso entrenamiento cardiovascular de una hora. La sangre se recogió mediante venopunción usando un Vacutainer™ que contenía heparina sódica (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). Los tubos con sangre se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos, y se recogió plasma y se dividió en alícuotas en cantidades de 1 ml y se almacenó a -80 °C para uso futuro.

Las muestras de plasma se descongelaron a temperatura ambiente. Las mediciones de ORP se registraron usando un Electrodo Redox MI-800/410 cm (Microelectrodes, Inc., Bedford, NH, EE. UU.) conectado a un medidor de mesa de pH/mV/temperatura HI4222 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EE. UU.). El electrodo se sumergió en una muestra de plasma, y se registró una lectura de ORP en situación de equilibrio en milivoltios (mV).

Los resultados se presentan en la tabla 3 a continuación. Tal como puede verse a partir de la tabla 3, el ORP de los plasmas de estas atletas de alto rendimiento disminuyó después del ejercicio.

TABLA 3

Muestra de paciente	Ejercicio	ORP (mV)	Cambio (+/-)
GR 1814-01	No	-39,4	
GR 1814-02	Sí	-46,0	-6,6
GR 1815-01	No	-35,5	
GR 1815-02	Sí	-38,3	-2,8
GR 1816-01	No	-40,7	
GR 1816-02	Sí	-44,4	-3,7
GR 1817-01	No	-49,5	
GR 1817-02	Sí	-49,2	+0,3
Cambio medio			-3,2

EJEMPLO 4: ORP de plasma de un paciente gravemente enfermo que padece una infección vírica

El paciente GR-1029 fue ingresado en la unidad de cuidados intensivos del Swedish Hospital, Englewood, Colorado con síntomas similares a los de la gripe, neumonía e insuficiencia respiratoria desencadenada por exposición a excrementos y orina de rata mientras limpiaba la jaula de una rata mascota. Al paciente se le diagnosticó que probablemente tenía una infección vírica transmitida por roedores.

Este estudio recibió la aprobación de la Junta de Revisión Institucional de HCA-HealthOne de acuerdo con las directrices publicadas por la Oficina para la protección de los seres humanos en la investigación (HHS Office for Protection from Research Risk).

Se recogió sangre de este paciente varios días durante su hospitalización (véase la tabla 4 a continuación) por venopunción usando un Vacutainer™ que contenía heparina sódica (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). El plasma se dividió en alícuotas en cantidades de 1 ml y se almacenó a -80 °C para uso futuro.

Las muestras de plasma se descongelaron a temperatura ambiente. Las mediciones de ORP se registraron usando un Electrodo Redox MI-800/410 cm (Microelectrodes, Inc., Bedford, NH, EE. UU.) conectado a un medidor de mesa de pH/mV/temperatura HI4222 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EE. UU.). El electrodo se sumergió en una muestra de plasma, y se registró una lectura de ORP en situación de equilibrio en milivoltios (mV).

Los resultados se presentan en la tabla 4 a continuación. Tal como puede verse a partir de la tabla 4, el ORP era el más alto durante los 8 primeros días después del ingreso y a continuación declinaba hasta que el paciente recibía el alta, de una manera similar a pacientes con traumatismo gravemente enfermos (véase el ejemplo 2). Sin embargo, el nivel de ORP para el paciente GR-1029 no volvió a niveles normales (-52,0 mV ± 3,1 SEM) antes del alta. Los niveles de ORP se correlacionaban con acontecimientos clínicos registrados en el historial médico del paciente, con niveles de ORP aumentados indicando un empeoramiento del estado del paciente y niveles de ORP disminuidos indicando una mejora del estado del paciente.

Tabla 4

TIEMPO (días)	ORP (mV)
1,0	73,0
1,5	78,8
8,0	59,5
9,0	36,6
10,0	60,6
11,0	17,7
12,0	33,6
16,0	3,8
22,0	-13,2
23,0	-12,4
24,0	-26,3
25,0	-14,0
26,0	1,7
30,0	-34,2
31,0	-20,9
33,0	-7,8
36,0	-9,5
37,0	-15,8
38,0	-20,0

EJEMPLO 5: Monitorización de producto sanguíneo almacenado (PBRC)

5 La lesión pulmonar aguda postransfusional (TRALI) es un efecto adverso de transfusión y es la causa principal de muerte relacionada con la transfusión. Silliman et al., Blood, 105: 2266-2273 (2005). Tiempos de almacenamiento más prolongados de glóbulos rojos concentrados (PBRC) y otros productos sanguíneos han sido asociados con un mayor riesgo de desarrollar TRALI en pacientes a los que se les realizó una transfusión. Véase Biffi et al., J. Trauma, 50: 426-432 (2001).

10 Un total de 10 bolsas de transfusión que contenían PBRC almacenados en tampón adenina, citrato y dextrosa (ACD) a 4 °C de acuerdo con los criterios de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (American Association of Blood Banks) se obtuvieron de Bonfils Blood Center (Denver, CO). En Bonfils, se recogió una muestra de cada bolsa de PBRC los días de almacenamiento 1 y 42. Las muestras se centrifugaron inmediatamente a 1000 g a 4 °C durante 10 minutos, y los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -80 °C hasta análisis adicional.

15 El potencial de oxidorreducción (ORP) se midió a temperatura ambiente en los sobrenadantes de la muestra tanto del día 1 como del día 42. Las mediciones de ORP se registraron usando un micro Electrodo Redox MI-800/410 cm de Pt/AgCl (Microelectrodes, Inc., Bedford, NH, EE. UU.) conectado a un medidor de mesa de pH/mV/temperatura HI4222 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EE. UU.). El electrodo se sumergió en un sobrenadante de muestra, y se registró una lectura de ORP en situación de equilibrio en milivoltios (mV).

20 Los resultados se presentan en la tabla 5 a continuación. Se usó un test de t de Student para comparar los datos del día 1 frente a los del día 42 para ensayar para diferencias significativas ($p < 0,05$, Microsoft Excel). Tal como puede verse, el ORP aumentaba significativamente ($p < 0,05$) en las muestras del día 42 ($98,1 \text{ mV} \pm 21,9 \text{ SD}$) en comparación con las muestras del día 1 ($62,6 \text{ mV} \pm 21,5 \text{ SD}$).

25 Para fines de validación del método, se determinó la oxidación de proteínas en los sobrenadantes de muestra midiendo proteínas en plasma en los sobrenadantes mediante espectrometría de masas (MS). Los sobrenadantes de muestra se analizaron por HPLC (Módulo de separación 2795 de Waters, Milford, MA, EE. UU.) acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por electropulverización positiva (+ESI-TOF MS, LCT, Micromass, Reino Unido) usando un método descrito anteriormente. Bar-Or et al., Crit. Care Med., 33: 1638-1641 (2005). Se inyectaron 10 μl de cada muestra en una Columna de HPLC YMC-Pack Protein-RP (Waters, Milford, MA, EE. UU.) calentada a 50 °C. Se utilizó un gradiente lineal de 20 minutos del 10 al 40 % B usando agua/ácido trifluoroacético al 0,1 % (A) y se utilizó AcN/TFA al 0,1 % (B) con un caudal de 1 ml/min. Para cada proteína del plasma detectada, el espectro de MS se deconvolucionó a la masa parental sin cargar usando el software MaxEnt 1 (Micromass, Reino Unido). El espectro de masa parental se integró a continuación y se calcularon proporciones relativas de cada especie usando un avanzado, paquete de software de integración de MS patentado, de desarrollo propio.

Las modificaciones por oxidación de albúmina de suero humano (HSA) incluyen cisteinilación de cisteína 34 y modificación con deshidroalanina (DHA) de lisina 487. El porcentaje de especies de HSA oxidadas aumentó significativamente en los sobrenadantes desde el día 1 ($44,1 \% \pm 6,9$ SD) hasta el día 42 ($72,1 \% \pm 8,4$ SD).

Otras proteínas del plasma identificadas en los sobrenadantes mediante MS fueron cadena α de hemoglobina (α Hb), cadena β de hemoglobina (β H), apolipoproteína A1 (ApoA1) y transtiretina (TTR). Se observaron niveles significativamente más altos de modificaciones por oxidación de α Hb, β Hb y TTR en los sobrenadantes del día 42 en comparación con los sobrenadantes del día 1 ($p < 0,05$). Además, para α Hb y ApoA1, se observaron especies que tenían un aminoácido C-terminal escindido, lo que indicaba la presencia de actividad carboxipeptidasa, un marcador de inflamación.

Los datos demuestran la presencia de un entorno oxidativo en PBRC, que aumenta con el tiempo de almacenamiento. Esto podría explicar parcialmente el mayor riesgo de desarrollar TRALI relacionada con la transfusión de productos sanguíneos más antiguos.

Por consiguiente, el ORP de PBRC y otros productos sanguíneos almacenados debe monitorizarse, y el ORP de pacientes que recibirán los productos sanguíneos también debe monitorizarse. Un paciente que tiene un estrés oxidativo significativo (es decir, tiene un nivel de ORP alto) debe recibir una transfusión con productos sanguíneos más frescos que contengan menos especies pro-oxidantes (es decir, tengan un nivel de ORP más bajo). Tener en cuenta el estado oxidativo del paciente y del producto sanguíneo debe dar como resultado una disminución de factores de riesgo relacionados con transfusión tales como TRALI.

Tabla 5

N.º de muestra de PBRC	ORP del día 1 (mV)	ORP del día 42 (mV)
054A	41,4	88,5
056A	48,9	113,8
057A	105,2	124,6
058A	77,4	131,2
059A	70,3	115,5
060A	88,0	100,7
061A	48,8	80,6
062A	52,2	73,5
063A	46,8	75,2
064A	46,7	77,1
Media:	62,6	98,1
Desviación estándar (SD)	21,5	21,9
Error estándar de la media (SEM)	6,8	6,9
Valor p	0,0018	
% de cambio	+56,7 %	

EJEMPLO 6: Monitorización e identificación de pacientes con lesión por traumatismo craneoencefálico

En este experimento, se determinó estado oxidativo global de pacientes con lesiones por traumatismo craneoencefálico aisladas (ITBI) midiendo el potencial de oxidorreducción (ORP) del plasma de los pacientes.

Se obtuvieron muestras de sangre completa sucesivas de varios pacientes con ITBI (puntuación de lesión abreviada (AIS) ≥ 3 , N = 32) y demográficamente similares a pacientes sin traumatismo craneoencefálico (N = 26) casi a diario hasta recibir el alta hospitalaria. También se recogió sangre completa de pacientes con ITBI de menor a moderada (AIS ≤ 2 , N = 18) y voluntarios sanos (N = 22). El plasma se dividió en alícuotas en cantidades de 1 ml y se almacenó a -80°C para uso futuro.

Las mediciones de ORP se registraron a temperatura ambiente usando un micro Electrodo Redox MI-800/410 cm de combinación de Pt/AgCl (Microelectrodes, Inc., Bedford, NH, EE. UU.) conectado a un medidor de mesa de pH/mV/temperatura HI4222 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EE. UU.). Las muestras de plasma se descongelaron, y el electrodo de ORP se sumergió en el plasma. Se registró una lectura en milivoltios (mV) después de que el valor de ORP fue estable durante 5 segundos.

El ORP en plasma aumentó durante los cinco primeros días de hospitalización y se aproximó a niveles normales en el momento del alta en todos los grupos de traumatismo. El ORP en el momento de la presentación era

significativamente elevado en todos los pacientes con traumatismo en comparación con controles sanos ($p < 0,05$). El ORP máximo se detectó el día 6 para pacientes con ITBI grave y sin traumatismo craneoencefálico. Sin embargo, los valores de ORP máximo fueron significativamente más altos ($p < 0,05$) en el grupo de ITBI grave ($+8,5 \text{ mV} \pm 3,4 \text{ SEM}$) en comparación con el grupo sin lesión craneoencefálica ($-5,2 \text{ mV} \pm 2,9 \text{ SEM}$).

- 5 Estos resultados demuestran la presencia de un entorno oxidativo en el plasma de pacientes con traumatismo, incluyendo especialmente pacientes con ITBI grave. Por lo tanto, la monitorización del ORP es una herramienta útil para valorar el grado de estrés oxidativo, la gravedad de la lesión y la eficacia del tratamiento en pacientes con ITBI.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* de evaluación y monitorización de un paciente, en el que el paciente ha padecido un traumatismo seleccionado entre el grupo que consiste en un traumatismo craneoencefálico, un traumatismo contuso, una fractura ósea y una quemadura, comprendiendo el método las siguientes etapas:
 - a. medir el potencial de oxidorreducción (ORP) de una muestra de fluido corporal del paciente seleccionada entre suero o plasma; y
 - 10 b. realizar una o ambas de las siguientes etapas:
 - i. determinar si el ORP es significativamente diferente del ORP del mismo fluido corporal de pacientes normales; y/o
 - 15 ii. si el ORP del fluido corporal del paciente se ha medido al menos una vez antes de la medición actual, determinar si el ORP ha aumentado o disminuido en comparación con la medición o mediciones anteriores.
- 20 2. Un método *in vitro* de evaluación y monitorización de un paciente, en el que el paciente está gravemente enfermo o se sospecha que está gravemente enfermo, comprendiendo el método las siguientes etapas:
 - a. medir el potencial de oxidorreducción (ORP) de una muestra de fluido corporal del paciente seleccionada entre suero o plasma; y
 - 25 b. realizar una o ambas de las siguientes etapas:
 - i. determinar si el ORP es significativamente diferente del ORP del mismo fluido corporal de pacientes normales; y/o
 - 30 ii. si el ORP del fluido corporal del paciente se ha medido al menos una vez antes de la medición actual, determinar si el ORP ha aumentado o disminuido en comparación con la medición o mediciones anteriores.
- 35 3. Un método *in vitro* de evaluación y monitorización de un paciente, en el que el paciente ha sufrido un infarto de miocardio o se sospecha que ha sufrido un infarto de miocardio, comprendiendo el método las siguientes etapas:
 - a. medir el potencial de oxidorreducción (ORP) de una muestra de fluido corporal del paciente seleccionada entre suero o plasma; y
 - 40 b. realizar una o ambas de las siguientes etapas:
 - i. determinar si el ORP es significativamente diferente del ORP del mismo fluido corporal de pacientes normales; y/o
 - 45 ii. si el ORP del fluido corporal del paciente se ha medido al menos una vez antes de la medición actual, determinar si el ORP ha aumentado o disminuido en comparación con la medición o mediciones anteriores.
- 50 4. El método de la reivindicación 1, en el que el traumatismo es un traumatismo craneoencefálico.
5. El método de la reivindicación 2, en el que la medición del ORP se usa como parte de una evaluación para determinar si el paciente está o no gravemente enfermo.
6. El método de la reivindicación 3, en el que la medición del ORP se usa como parte de una evaluación para determinar si el paciente está sufriendo o no un infarto de miocardio.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ORP se monitoriza para determinar la eficacia de un tratamiento del paciente.
8. El método de la reivindicación 1-7, en el que el ORP se monitoriza para determinar si el estado del paciente está mejorando o empeorando.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el ORP se mide una o varias veces al día.