



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE PACIENTES
SOMETIDOS A CIRUGIA CORONARIA Y
RELACIÓN DE CARBONILACIÓN DE
PROTEÍNAS CARDIACAS CON APARICIÓN DE
FIBRILACIÓN AURICULAR POSTOPERATORIA**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

MARGARITA ALEJANDRA SOLIS MITRE

Profesor Patrocinante:

Dra. Lorena García N.

Directores de Memoria:

Dr. Sergio Lavandero G.

Dr. Juan Roldán S.

SANTIAGO, 2010

A mis Padres:

José y Sylvia

Agradecimientos

Llegar a esta instancia es algo muy gratificante para mí, ya que me implico el sacrificio de vivir lejos de mis seres queridos, en especial de mis padres, de los cuales siempre sentí un apoyo constante en la búsqueda de mis sueños y metas. Sin ustedes esto no hubiese sido posible.

Mi historia comienza en Osorno, pasa por Valdivia y finalmente termina aquí en Santiago. Lugar al cual llegué acompañada de Christopher, mi pareja, mi compañía, a quien también le doy mis más sinceros agradecimientos ya que siempre me apoya sin cuestionar.

También quisiera agradecer a todos mis queridos amigos(as) que conocí en mi etapa de estudiante acá en la Universidad De Chile: Pamela Gómez, Ronnie Jara, Eduardo Cutiño, Fabiola Tapia (nana), Ivonne Olmedo y entre otros.

Tampoco debo dejar fuera de estos agradecimientos a las personas que conocí durante mi etapa de tesista, me refiero a aquellos pertenecientes a los laboratorios de Farmacogenómica y Transducción de Señales Moleculares de la Célula, en donde encontré un cálido grupo humano siempre dispuesto a ayudar. Así que aquí va un gran saludo para: Zully Pedroso, Christian Pennanen, Rodrigo Troncoso, Hugo Verdejo, Prof. Mario Chiong y en especial a mis amigos(as) Juan Roldán, Elia Becerra y Pamela Contreras de los cuales me llevo los mejores recuerdos debido a los muchos momentos de risas compartidos y en especial por su comprensión y paciencia hacia mí.

También un agradecimiento a los profesores que hicieron factible esta memoria Sergio Lavandero, Rosemarie Mellado, Lorena García.

Otro agradecimiento es para Julito de la biblioteca por su gran disposición de a ayudarme.

Financiamiento

Esta memoria de título se realizó en los laboratorios de Farmacogenómica y de Transducción de Señales Moleculares de la Célula de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y se financió por los Proyectos FONDECYT 1070641, DI MULT 06/09-2 y FONDAP 15010006.

Índice

	Página
Financiamiento	4
Índice.....	5
Resumen	10
Abstract	12
Abreviaturas	14
1. Introducción	16
1.1. Enfermedades cardiovasculares y fibrilación auricular	16
1.1.1. Datos epidemiológicos	16
1.1.2. Descripción del cuadro de fibrilación auricular	16
1.2. Estrés oxidativo.....	18
1.3. Sistemas antioxidantes	20
1.4. Estrés oxidativo y fibrilación auricular	21
1.5. Oxidación de proteínas (carbonilación de proteínas)	21
2. Hipótesis.....	23
3. Objetivos.....	24
3.1. Objetivo general.....	24
3.2. Objetivos específicos	24
4. Metodología	25
4.1. Diseño experimental	25
4.1.1. Tipo de estudio	25

4.1.2. Lugar de realización.....	25
4.1.3. Presentación y aprobación de los Comités de Ética.....	25
4.1.4. Consentimiento informado	26
4.1.5. Tipo de pacientes.....	26
4.1.6. Ingreso de pacientes y toma de muestras.....	27
4.1.7. Pesquisa de fibrilación auricular.....	27
4.2. Materiales y equipos	27
4.2.1. Toma de muestras de sangre	27
4.2.2. Determinación de estrés oxidativo en muestras de sangre	28
4.2.3. Determinación de carbonilación en tejido.....	28
4.4. Procesamiento de muestras sanguíneas	29
4.5. Determinación de oxidación en carbonilación de proteínas en tejido	29
4.5.1. Homogenización de la muestra.....	29
4.5.2. Medición de proteínas.....	29
4.5.3. Derivatización de la muestra	30
4.5.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida	31
4.5.5. Electrotransferencia de proteínas.....	32
4.5.6. Western blot.....	32
4.6. Determinación de parámetros bioquímicos de estrés oxidativo a nivel sistémico.....	33
4.6.1. Determinación de actividad sistémica de superóxido dismutasa eritrocitaria.....	33
4.6.2. Determinación de actividad sistémica de catalasa	34
4.7. Análisis estadístico	34

5. Resultados.....	35
5.1. Caracterización de los pacientes	35
5.1.1. Distribución de pacientes y características antropométricas	35
5.1.2. Diagnósticos concomitantes y terapias farmacológicas.....	37
5.2. Niveles de carbonilación de proteínas en tejido auricular.....	41
5.2.1. Estandarización de la técnica de determinación de oxidación de proteínas	41
5.2.2. Determinación de estrés oxidativo local (en apéndice de corazón)	43
5.2.2.1 Resultados de la carbonilación de proteínas cardíacas.....	45
5.3. Determinación de estrés oxidativo sistémico.....	47
5.3.1. Relación de actividad de SOD con ocurrencia de FA postoperatoria	47
5.3.2. Relación de actividad de Catalasa con ocurrencia de FA postoperatoria	48
6. Discusión	50
7. Conclusiones	57
8. Bibliografía.....	58

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Clasificación de la FA basado en el patrón de arritmia.....	18
Tabla 2. Distribución de pacientes según hospital y sexo.	35
Tabla 3. Ocurrencia de FA post-operatoria.....	36
Tabla 4. Promedio de edad de acuerdo a aparición de FA postoperatoria.....	36
Tabla 5. Aparición de fibrilación auricular postoperatoria según estatura, peso e IMC, en el INT.	37
Tabla 6. Prevalencia de patologías concomitantes.	38
Tabla 7. Relación de enfermedades concomitantes con ocurrencia de FA postoperatoria.	38
Tabla 8. Uso de medicamentos antes de la cirugía.....	39
Tabla 9. Relación de consumo de medicamentos con ocurrencia de FA postoperatoria.	40

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Generación de EROs y detoxificación por parte de enzimas antioxidantes.	19
Figura 2. Carbonilación y derivatización.....	31
Figura 3. Film fotográfico representativo de carbonilación de proteínas del estándar interno.	41
Figura 4. Film fotográfico de β -actina.....	42
Figura 5. Gráfico de la estandarización de carbonilación de proteínas.....	43
Figura 6. Film fotográfico de carbonilación de proteínas representativo de una muestra de pacientes.....	44
Figura 7. Tinción con solución de azul de Coomassie.	44
Figura 8. Resultados de la carbonilación de proteínas en pacientes.	46
Figura 9. Actividad de la enzima SOD eritrocitaria.	47
Figura 10. Actividad de la enzima catalasa.....	49
Figura 11. Prevalencia de fibrilación auricular por edad y sexo en Estados Unidos	51

Resumen

La fibrilación auricular (FA) es una arritmia rápida e irregular que se puede presentar como una complicación post-operatoria en pacientes que se han sometido a cirugía cardiaca. La presencia de FA disminuye la calidad de vida del paciente y además aumenta la morbilidad y mortalidad y provoca mayores gastos hospitalarios.

Uno de los factores que puede contribuir a la aparición de FA es el estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la capacidad de los sistemas antioxidantes del organismo, a favor de los primeros. Las enzimas encargadas de neutralizar los radicales libres son superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa. Las EROs son beneficiosas en el sistema inmune como un medio de defensa frente a los patógenos y en señalización celular, pero también están involucradas en el origen de muchas enfermedades, debido a que pueden dañar el ADN, lípidos y proteínas. La carbonilación es un mecanismo de oxidación de proteínas y consiste en la reacción de grupos aldehídos o cetonas con aminoácidos (aa), provocando la oxidación irreversible de las proteínas, lo que conlleva una disfunción de la proteína, como pérdida de la actividad catalítica, modificación de los aa y fragmentación, entre otros efectos. Las consecuencias que tiene la carbonilación de proteínas a nivel global en el organismo son envejecimiento, enfermedad de Alzheimer, cáncer, diabetes y cuadros sépticos.

El objetivo de este estudio es comparar el nivel de carbonilación de proteínas en pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica (CRM), según si experimentan o no fibrilación auricular postoperatoria.

Para este estudio se reclutaron 114 pacientes con indicación de CRM en el Hospital Clínico de la Universidad Católica (HCUC) y en el Instituto Nacional del Tórax (INT). A todos ellos se los caracterizó con respecto a sexo, edad, índice de masa corporal (IMC), enfermedades concomitantes, y medicamentos consumidos antes de la cirugía y se les realizó un seguimiento en el postoperatorio para pesquisar la ocurrencia de FA postoperatoria. Al momento del ingreso al estudio los pacientes debieron firmar un consentimiento informado previamente aprobado por los respectivos comités de ética correspondientes a cada centro asistencial.

De los pacientes del HCUC se obtuvo muestras sanguíneas antes y después de la cirugía, en las que se determinó actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, y una muestra de orejuela cardiaca durante la cirugía, en la que se determinó el nivel de proteínas carboniladas. De los pacientes del INT se obtuvo sólo las muestras sanguíneas, en las que se determinó las actividades enzimáticas mencionadas.

La carbonilación de proteínas se realizó mediante derivatización de la muestra con 2,4-dinitrofenolhidrazina (DNPH), efectuando posteriormente un Western blot. La actividad enzimática de la SOD se midió mediante la inhibición de la autooxidación en medio alcalino de adrenalina a adrenocromo y la catalasa se determinó a través de su actividad degradativa del peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Ambas mediciones se efectuaron de forma cinética en un espectrofotómetro.

De la población analizada, un 27% desarrolló FA después de la cirugía. Los pacientes que desarrollaron FA mostraron una mayor edad y un IMC menor en comparación a los pacientes que no la desarrollaron. Las enfermedades concomitantes y el uso previo de medicamentos no mostraron efectos estadísticamente significativos sobre la incidencia de fibrilación auricular postoperatoria. Los pacientes que presentaron FA postoperatoria no mostraron niveles de carbonilación de proteínas en tejido auricular diferentes a los pacientes que no fibrilaron. Las actividades de SOD eritrocitaria y de catalasa tampoco mostraron diferencias entre ambos grupos de pacientes.

En conclusión, los niveles de carbonilación de proteínas cardiacas y la actividad plasmática de SOD eritrocitaria y catalasa no están relacionados con la ocurrencia de fibrilación auricular post-operatoria en pacientes sometidos a CRM.

Abstract

“Clinical characterization of patients submitted to coronary surgery and relationship between cardiac protein carbonylation and postoperative atrial fibrillation occurrence”

Atrial fibrillation (AF) is a rapid and irregular arrhythmia that can occur as a postoperative complication in patients who have undergone cardiac surgery. The presence of AF reduces the quality of life of patients and also increases morbidity and mortality and leads to higher hospital costs.

One factor that may contribute to the onset of AF is oxidative stress. Oxidative stress is an imbalance between production of reactive oxygen species (ROS) and the ability of the body's antioxidant systems to control them. The enzymes that neutralize free radicals are superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase. ROS are beneficial in the immune system as a means of defense against pathogens and in cell signaling, but are also involved in the origin of many diseases, because they can damage DNA, lipids and proteins. Carbonylation is a mechanism of protein oxidation and involves the reaction of aldehydes or ketones groups with amino acids (aa), causing irreversible oxidation of proteins, leading to dysfunction of the protein, such as loss of catalytic activity, modification of aa and fragmentation, among other effects. The implications of protein carbonylation globally in the body are aging, Alzheimer's, cancer, diabetes and septic.

The aim of this study is to compare protein carbonylation levels in patients undergoing myocardial revascularization surgery (MRS), depending on whether they experience postoperative atrial fibrillation or not.

This study enrolled 114 patients with MRS indication in Hospital Clínico de la Universidad Católica (HCUC) and Instituto Nacional del Tórax (INT). They were all characterized with respect to sex, age, body mass index (BMI), concomitant diseases and drugs used before surgery, and they were followed up postoperatively to look for the occurrence of postoperative AF. At the time of study entry, patients must have signed an informed consent previously approved by the respective ethics committees for each health care center.

Blood samples from HCUC patients were obtained before and after surgery, which were used to determine enzyme activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase, and a sample of atrial appendage during cardiac surgery was obtained too, which was used to determine the protein carbonyls level. From INT patients just blood samples were taken, which were used to determine the enzymatic activities above mentioned.

Protein carbonylation was performed by derivatization of the sample with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), performing then a Western blot. Sod enzymatic activity was measured by the inhibition of adrenaline to adrenochrome autoxidation in an alkaline medium, and catalase was determined through its hydrogen peroxide (H₂O₂) degradative activity. Both measurements were made on a spectrophotometer.

27% of included patients developed AF after surgery. Patients who developed AF were older and had a lower BMI compared to patients who did not. Concomitant illness and previous use of drugs showed no statistically significant effect on the incidence of postoperative atrial fibrillation. Patients who experienced postoperative AF showed no different protein carbonylation levels in atrial tissue than those patients who did not . Erythrocyte SOD and catalase activities also showed no differences between both groups of patients.

In conclusion, cardiac protein carbonylation levels and erythrocyte SOD and catalase plasmatic activity are not related to the occurrence of postoperative atrial fibrillation in patients undergoing MRS.

Abreviaturas

AAS: Ácido acetilsalicílico

Ac: Anticuerpo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AV: aurículo-ventricular

AVE: Accidente vascular encefálico

BSA: Albúmina sérica de bovino

CRM: Cirugía de revascularización miocárdica

DS: Desviación estándar

DM: Diabetes mellitus

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

DTT: 1,4-ditiotreitol

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

ECL: enhanced chemiluminescence (quimioluminiscencia aumentada)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EROs: Especies reactivas del oxígeno

FA: Fibrilación auricular

h: Hora

HTA: Hipertensión arterial

HCUC: Hospital Clínico de la Universidad Católica

Hb: Hemoglobina

HTA: Hipertensión arterial

IgG: Inmunoglobulina G

IMC: Índice de masa corporal

INT: Instituto Nacional del Tórax

mA: Miliamper

MDA: Malondialdehído

min: Minuto

mM: Milimolar

Na₃VO₄: Ortovanadato de sodio

nm : Nanómetro

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoruro

POAF: Fibrilación auricular post-operatoria

Redox: Reducción-oxidación

rpm: Revoluciones por minuto

SA: Sinoauricular

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

seg: Segundo

SEM: Error estándar de la media

T°: Temperatura

TBS-T: Amortiguador Tris salino con Tween 20

TCA: Ácido tricloro acético

Tris: Tris-(hidroximetil)-aminoetano

µg: Microgramo

µl: Microlitro

µM: Micromolar

V: Voltios

1. Introducción

1.1. Enfermedades cardiovasculares y fibrilación auricular

1.1.1. Datos epidemiológicos

Las enfermedades cardiovasculares son responsables del 30% de las muertes alrededor del mundo y en los países en vías de desarrollo este porcentaje es mayor ¹. Chile no está ajeno a esta situación, pues las probabilidades de muerte anual de los chilenos por afecciones cardiovasculares fueron de 18,9% en el 2003 con un importante riesgo de mortalidad de origen coronario (7,3%), por accidentes vasculares encefálicos (AVE) (6,1%) y un riesgo algo menor por hipertensión arterial (HTA) (1,7%), insuficiencia cardíaca (0,9%) y, arritmias (0,6%), entre otras ². Una proyección para el año 2010 de la mortalidad cardiovascular indica valores similares a éstos ², con tendencia al aumento debido al envejecimiento de la población ³. Es particularmente relevante el que más de la mitad de la población chilena en la actualidad tiene un riesgo cardiovascular alto o muy alto ³. Entre los factores de riesgo cardiovascular más importantes se encuentran HTA, dislipidemia, tabaquismo, la edad (ser mayor de 45 años en hombres y ser postmenopáusica en el caso de las mujeres), sobrepeso y diabetes mellitus ^{3,4}.

La fibrilación auricular (FA) es un problema común alrededor del mundo. En Estados Unidos afecta al 15% de la población mayor a 70 años y se estima que 2,2 millones de americanos sufren actualmente esta enfermedad. Se estima que para el 2030 habrá alrededor de 6 a 10 millones de individuos que la van a padecer alrededor del mundo. En Europa y Asia la incidencia de FA es alrededor del 7% de las personas mayores de 65 años ⁵. La presencia de FA se asocia con una mayor tasa de mortalidad, la que es aún más elevada en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva ⁵. La FA afecta la calidad de vida del paciente además de aumentar la morbilidad y mortalidad, acrecentando los días de hospitalización e incrementando los gastos hospitalarios ^{6,7}.

1.1.2. Descripción del cuadro de fibrilación auricular

La fibrilación auricular (FA) es una taquiarritmia supraventricular sostenida muy común y prevalente en la población adulta que se caracteriza por una activación rápida e irregular de la aurícula (por ejemplo, 400-600 impulsos de la pared muscular de la aurícula por minuto), con el consiguiente deterioro de su función contráctil ^{7,8}.

Frecuentemente la FA coexiste con condiciones médicas que favorecen su aparición. Algunas de estas causas son cardíacas, dentro de las cuales las más comunes son: cardiopatía isquémica, cardiopatía reumática, hipertensión y síndrome del nodo enfermo. Otras menos comunes son: cardiomiopatía, enfermedad pericárdica y mixoma auricular. Se describen también causas no cardíacas como: infecciones agudas (especialmente neumonía), carcinoma pulmonar, hipertiroidismo, embolismo pulmonar y otras patologías torácicas como el derrame pleural ⁷. La FA también es común después de una cirugía, especialmente después de operaciones cardioráxicas como bypass coronario. Al presentarse FA después de una cirugía se prolonga la estadía hospitalaria, se ve favorecida la aparición de insuficiencia cardíaca, accidentes cerebrovasculares y tromboembolismo, y se originan mayores costos hospitalarios ⁷.

En condiciones fisiológicas, el impulso cardíaco nace en el nodo sinoauricular (SA), se propaga a través de las aurículas, atraviesa el nodo aurículo-ventricular (AV) y mediante el sistema especializado de conducción de His-Purkinje, invade ambos ventrículos, que responden a la onda de propagación contrayéndose en forma sincrónica ⁹. En la FA se produce un desequilibrio de la conducción del impulso cardíaco debido a la ausencia de las ondas P que activan el potencial de acción, produciéndose una respuesta ventricular irregular, cuando el nodo AV está intacto ⁶. Existen tres mecanismos que dan cuenta de la FA que se explican por sí solos, pero no son excluyentes entre sí, esto quiere decir que en la FA pueden existir 1 o más mecanismos simultáneamente: A) el *circuito múltiple de reentrada*, en el que la persistencia de múltiples circuitos de reentrada depende de la presencia continua de tejido excitable al cual se enfrenta la propagación de la onda de depolarización y en el cual se sugiere que la longitud de esa onda de depolarización se encuentra disminuida, acortando el periodo refractario efectivo, bajando la velocidad de conducción, reduciendo el tamaño del circuito al mínimo, permitiendo finalmente que la aurícula se acomode a la presencia de un mayor número de circuitos, por lo que un aumento del tamaño de la aurícula favorecerá el que más circuitos coexistan. B) la *actividad ectópica*, que se deriva de una mayor automatización que la normal o una actividad anticipada o un potencial de acción anormal. La automatización anormalmente aumentada resulta en una fase 4 acelerada; el potencial de acción, al no completarse la fase 4, causa una sobrecarga de calcio intracelular, produciendo arritmias y falla cardíaca. C) el *circuito simple de reentrada*, en donde se propone que la onda en el potencial de acción es más corta, tendiendo a ser menos estable ¹⁰⁻¹².

Desde el punto de vista clínico, todos los pacientes con FA se clasifican inicialmente en la categoría de FA detectada por primera vez. Estos pacientes pueden haber tenido (o no) otros episodios previos que no han sido detectados. Si un primer episodio detectado termina por sí mismo en menos de 7 días, pertenece a la categoría de FA paroxística. En la mayoría de los pacientes con FA paroxística los episodios terminan por sí mismos en menos de 24 horas. Si, en cambio, el episodio dura más de 7 días, no es probable que termine por sí mismo y se llama FA persistente. En este caso, el episodio podría terminarse con cardioversión. Si la cardioversión no es eficaz o no se intenta, y el episodio continúa durante largo tiempo (por ejemplo, un año o más), es una FA permanente ⁷. Lo anterior se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de la FA basado en el patrón de arritmia ⁷

Subtipos de FA	Características
Evento de inicio (1° episodio)	Puede ser sintomático o asintomático, inicio desconocido
Paroxística	Episodios recurrentes que terminan por sí mismos en menos de 7 días
Persistente	No termina por sí misma antes de 7 días o requiere cardioversión
Permanente	Si no se termina la FA, si cuando termina hay recaídas o si no se logra una cardioversión exitosa

1.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un estado fisiopatológico causado por un desequilibrio entre la producción de EROs y la capacidad del organismo de eliminar rápidamente las moléculas reactivas intermedias o de reparar el daño resultante ¹³. Un desbalance en el estado normal redox puede causar efectos tóxicos a través de la producción de especies reactivas radicalarias y no radicalarias, que dañan las proteínas, lípidos y ADN de la célula (Figura 1) ^{13, 14}.

Las EROs se clasifican en radicales libres como anión superóxido (O_2^-) e hidroxilo ($OH\cdot$) y en especies no radicalarias como peróxido de hidrogeno (H_2O_2) e hipoclorito ($HOCl$) ¹⁴.

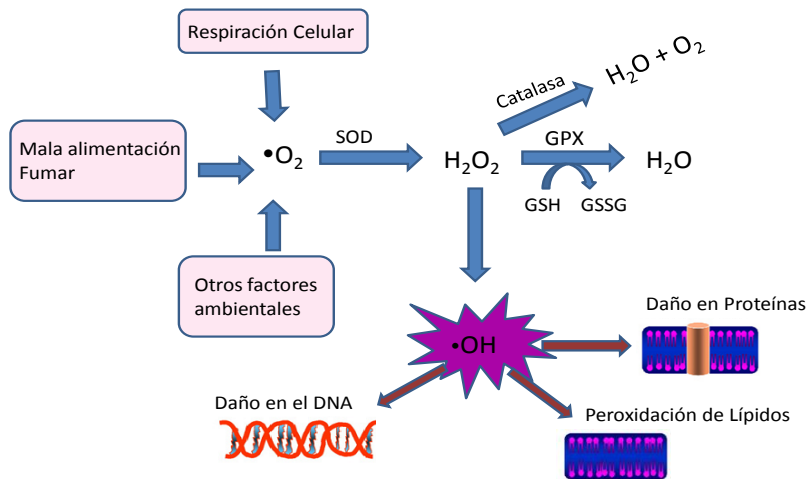


Figura 1. Generación de EROs y detoxificación por parte de enzimas antioxidantes. Múltiples factores como la alimentación, factores ambientales, la respiración celular, entre otros, pueden generar radicales libres como el superóxido, que son procesados por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) eliminando su toxicidad. La SOD cataliza el superóxido en oxígeno (O_2) y en peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el que a su vez es catalizado por la catalasa en agua (H_2O) y en O_2 y por la glutatión peroxidasa (GPX) en H_2O . Los radicales que no son eliminados atacan al DNA, lípidos y proteínas. (Adaptado de Dalle-Donne et al. ¹⁵)

Existen varios sistemas de producción de EROs que incluyen la cadena transportadora de electrones ¹⁶, la NADPH oxidasa ¹⁷, la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintasa y la ciclooxigenasa ^{18,19}.

Las EROs son beneficiosas en el sistema inmune como un medio de defensa frente a los patógenos y en señalización celular ²⁰, pero también están implicadas en envejecimiento, apoptosis, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades pulmonares y enfermedades cardiovasculares ^{14,19}.

Se les relaciona en particular con el desarrollo y progresión de varias enfermedades cardiacas, constituyéndose el estrés oxidativo, por lo tanto, en un factor determinante de estas patologías ²¹. Los factores de riesgo cardiovascular son elementos clínicos, poblacionales o ambientales que están asociados al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, y de ellos existen dos categorías: modificables y no modificables. Entre los factores modificables encontramos el consumo de tabaco y etanol, la dieta y la presencia de algunas enfermedades concomitantes como diabetes mellitus e hiperlipidemia. Los no modificables son la edad (mayores de 45 años), antecedentes personales de enfermedad cardiovascular y antecedentes familiares de enfermedades cardiovasculares sólo cuando éstas afectan a familiares de 1er grado (madre, padre o hermanos) antes de los 55 años en los varones y 65 en las mujeres. Todos estos factores por sí solos son productores de radicales libres ²².

1.3. Sistemas antioxidantes

Su función primordial es disminuir los niveles intracelulares de EROs, proporcionando una función protectora frente a los oxidantes biológicos. Los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante consisten en una serie de enzimas que actúan coordinadamente. Ellas son superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPX) (Figura 1) ²⁰.

La SOD y la catalasa son metaloproteínas que catalizan reacciones de dismutación, las cuales eliminan el O_2^- y el H_2O_2 respectivamente. La SOD cataliza la dismutación de O_2^- en oxígeno y H_2O_2 y la catalasa cataliza la descomposición del H_2O_2 en oxígeno y agua ²³. La SOD es una enzima que está presente en dos isoformas en el corazón: Mn-SOD, presente en la matriz mitocondrial, y la forma citosólica Cu/Zn-SOD ²⁴. La catalasa, en cambio, se localiza en los peroxisomas ²⁴. En ausencia de la catalasa se acumula H_2O_2 , el cual, en presencia de metales de transición tales como hierro o cobre, genera el radical hidroxilo que posee elevada reactividad para reaccionar con las macromoléculas.

Un mal funcionamiento de estas enzimas, o el hecho de que los radicales libres sobrepasen su sistema antioxidante, se ha relacionado con diversas enfermedades, y el sistema cardiovascular no está ajeno a esta situación ²³. Es así como a la SOD se le ha relacionado con la FA ²⁵, mientras que la catalasa en cambio se encuentra asociada a disfunción de la contracción cardíaca ²⁶.

1.4. Estrés oxidativo y fibrilación auricular

Hay evidencia de que el estrés oxidativo se relaciona con la presencia de FA²⁷⁻²⁹. Mihm et al.³⁰ fueron los primeros en investigar el estado energético de las miofibrillas y la modificación de las proteínas en una biopsia de apéndice auricular derecho en pacientes con FA crónica, comparándolas con las de pacientes en ritmo sinusal. El daño oxidativo en las miofibrillas habría sido mediado por la acción de radicales libres (OH·) y peroxinitritos, formando proteínas carboniladas y nitrotirosinas, respectivamente³⁰.

También se ha encontrado que en pacientes que desarrollan FA después de cirugía aumenta la actividad de la NADPH oxidasa a nivel auricular en comparación con pacientes en ritmo sinusal³¹.

Otro estudio investigó marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en pacientes que se someten a bypass coronario. Se encontró que en los pacientes que desarrollaron FA después de la cirugía, fue significativamente mayor la elevación de los niveles postquirúrgicos de peróxido, comparados con pacientes en ritmo sinusal, a 6 h de transcurrida la cirugía³².

1.5. Oxidación de proteínas (carbonilación de proteínas)

Las EROs y otros radicales, que se generan como subproductos del metabolismo celular o a partir de fuentes ambientales, causan la oxidación en los aminoácidos integrantes de las proteínas, lo que conlleva a la pérdida de la función proteica y de la actividad enzimática. Las proteínas modificadas por oxidación pueden fragmentarse directamente o pueden reaccionar covalentemente por entrecruzamiento formando grandes agregados de una gran hidrofobicidad²⁰.

En general, el grado de daño oxidativo de un blanco específico depende de varios factores: la concentración del blanco, la constante de reacción del oxidante con el blanco, la localización del blanco con respecto al lugar de generación del oxidante, eventos oxidantes secundarios (reacciones en cadena), reacciones antioxidantes y reacciones de reparación. Con base en estas consideraciones de naturaleza meramente cinética, se han diseñado sistemas computacionales que predicen el grado de daño de diferentes macromoléculas³³. Sin embargo, dentro de una célula, parecen ser muchas más las consideraciones a tomar en cuenta para predecir el grado de daño de una macromolécula

dada, pues, a la fecha, los datos de modelaje computacional no son consistentes con la evidencia experimental ³³.

La oxidación de proteínas es un biomarcador de estrés oxidativo y se puede presentar de distintas formas, como carbonilación, nitración ³⁰, glutationilación y S-nitrosilación ¹³. Estas dos últimas son reacciones de tipo reversible, pero carbonilación y nitración son de tipo irreversible, lo que significa que si la célula las experimenta, no cuenta con mecanismos enzimáticos para reparar o degradar la proteína oxidada ¹³. Todas las proteínas de nuestro organismo son susceptibles de experimentar el ataque de las especies reactivas del oxígeno, lo que origina en las proteínas la presencia de grupos carbonilos ³⁴

La carbonilación consiste en la formación de grupos carbonilos (aldehídos o cetonas) en los aminoácidos (aa) ³⁵. Hay enfermedades que están asociadas con un aumento de la carbonilación como son las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer, el cáncer, la diabetes mellitus y cuadros sépticos ^{34, 36}.

De los antecedentes expuestos, y con el fin de contribuir a explicar los mecanismos que provocan la aparición de fibrilación auricular, creemos importante investigar si los pacientes que desarrollan FA postoperatoria presentan un estado de estrés oxidativo a nivel del tejido cardíaco, y si este estado se correlaciona con el comportamiento de sus marcadores sistémicos.

2. Hipótesis

En pacientes que se someten a cirugía coronaria y presentan fibrilación auricular postoperatoria, el nivel de proteínas cardíacas carboniladas está aumentado con respecto a los que no la presentan.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Determinar si el nivel de carbonilación de proteínas cardíacas en pacientes sometidos a cirugía coronaria, difiere según si experimentan o no fibrilación auricular postoperatoria.

3.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar una población de pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica.
2. Determinar la ocurrencia de FA postoperatoria en el grupo de pacientes estudiados.
3. Determinar la actividad plasmática pre y postoperatoria de los sistemas enzimáticos antioxidantes SOD y catalasa.
4. Relacionar la actividad plasmática de SOD y catalasa con la ocurrencia de FA post-operatoria.
5. Determinar la carbonilación de proteínas en tejido cardíaco en un subgrupo de pacientes.
6. Relacionar la carbonilación de proteínas en tejido cardíaco con la ocurrencia de FA post-operatoria en pacientes sometidos a cirugía coronaria.

4. Metodología

4.1. Diseño experimental

4.1.1. Tipo de estudio

Prospectivo, multicéntrico. Para reunir un grupo de pacientes homogéneo que presentaran FA, se optó por pacientes que se van a someter a cirugía de revascularización miocárdica electiva, ya que se ha visto que pacientes que se someten a este tipo de cirugía pueden presentar FA^{32, 37, 38}. Según lo descrito por Ramlawi et al³², el aumento perquirúrgico de la carbonilación de las proteínas cardíacas es 4 veces mayor en pacientes que fibrilan que en los que no, y la desviación estándar promedio fue de 0,8. Dados estos valores y aplicada una prueba estadística de tamaño muestral para una potencia de 80% y un valor de alfa de 0,05, un tamaño de muestra adecuado es tan pequeño como 2 pacientes por grupo, por lo que cualquier tamaño de muestra superior a éste será adecuado para encontrar una diferencia como la descrita.

4.1.2. Lugar de realización

El reclutamiento de pacientes se realizó en los hospitales Clínico de la Universidad Católica (HCUC) y del Instituto Nacional del Tórax (INT). En todos ellos se realizó toma de muestras de sangre previo a la operación y en una ventana de tiempo de 48-72 h después de la operación para determinar actividad enzimática antioxidante sistémica (SOD, CAT). En el grupo de pacientes del HCUC se tomó, además, una muestra de tejido cardíaco (orejuela auricular derecha) para determinar carbonilación de proteínas. La toma de muestras se realizó en los mismos centros asistenciales en forma separada de las tomas de muestras destinadas a manejo clínico y por profesionales especialmente comisionados para tal fin.

4.1.3. Presentación y aprobación de los Comités de Ética

Este estudio se preocupó de proteger la integridad del paciente de acuerdo a las normas éticas contenidas en la declaración de Helsinki. Se obtuvo la aprobación de los comités de ética respectivos para los protocolos de estudio utilizados en cada uno de los centros asistenciales involucrados.

4.1.4. Consentimiento informado

Para iniciar el reclutamiento de pacientes, el consentimiento informado debió ser aprobado por el comité de ética respectivo. Este documento especificó los objetivos del estudio, el procedimiento al que sería sometido el paciente, los riesgos a que se vería expuesto y los derechos del paciente en esta investigación clínica. La participación del paciente fue totalmente voluntaria e informada, para lo que se le leyó y explicó al paciente el contenido del documento. Una vez concluida la explicación, cada paciente que quiso participar del estudio firmó el consentimiento informado.

4.1.5. Tipo de pacientes

Pacientes que se sometieron a CRM y cumplían con los siguientes criterios:

a) **Criterios de inclusión:**

- Ambos sexos.
- Mayores de 18 años
- Pacientes coronarios con indicación de cirugía de revascularización miocárdica electiva y en ritmo sinusal al momento de la operación, con función sistólica preservada (fracción de eyección de VI >45%).
- Consentimiento informado firmado.

b) **Criterios de exclusión:**

- Pacientes con evento coronario en curso.
- Cirugía de urgencia o shock cardiogénico preoperatorio.
- Pacientes con pericarditis o miocarditis aguda preoperatoria.
- Pacientes con antecedentes de patología neoplásica o reumatológica u otras patologías inflamatorias crónicas en tratamiento. Pacientes con tratamiento esteroideal crónico hasta 1 mes previo a la cirugía.
- Insuficiencia renal terminal (creatininemia > 3 mg/dl) o hepática.
- Hipertiroidismo

4.1.6. Ingreso de pacientes y toma de muestras

La pesquisa de pacientes se hizo de acuerdo a la programación de las cirugías en cada uno de los centros hospitalarios. Antes de la realización programada de la cirugía del paciente se procedió a la revisión de la ficha clínica, para constatar los criterios de exclusión y inclusión. Una vez evaluada la ficha, se entrevistó al paciente para informarle, e invitarle a participar del estudio y, obtenida la firma del consentimiento informado, se procedió a la extracción de una muestra de sangre de 4 mL correspondiente al preoperatorio por parte de la enfermera. La muestra fue puesta en hielo y llevada rápidamente al laboratorio para ser procesada y almacenada a -20°C según protocolo, para posteriormente realizar la determinación de las actividades de SOD y CAT. A las 48 a 72 h de efectuada la cirugía, se realizó la segunda toma de muestra sanguínea, correspondiente al postoperatorio.

En el HCUC se realizó adicionalmente una toma de muestra de tejido auricular durante la cirugía, que se realizó con una cánula, colocándola inmediatamente en nitrógeno líquido, para luego guardarla en un freezer a -80°C hasta el momento de la determinación de la carbonilación de las proteínas cardíacas.

4.1.7. Pesquisa de fibrilación auricular

La pesquisa de FA en los pacientes se efectuó mediante la ficha clínica, mediante una revisión retrospectiva de la ficha clínica después del quinto día del post-operatorio, calificando como fibrilación auricular cualquier consignación de dicha situación clínica efectuada en dicha ficha en el transcurso de los 5 días posteriores a la operación.

4.2. Materiales y equipos

4.2.1. Toma de muestras de sangre

- Jeringas de 10 mL con aguja de 21Gx1,5
- Tubos Vacutainer estériles de 5 mL pretratados con heparina.
- Algodón
- Alcohol desnaturalizado 96°
- Las muestras se almacenaron a -20°C luego de procesarlas.

4.2.2. Determinación de estrés oxidativo en muestras de sangre

Equipos:

- Espectrofotómetro
- pHmetro
- Baño termostático
- Cubetas de cuarzo

Reactivos:

- El estándar de superóxido dismutasa, glicina, adrenalina, Triton X-100, sales fosfatos y EDTA, **Sigma Chemical Co.**
- El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), cloroformo, y etanol, **Merck**

4.2.3. Determinación de carbonilación en tejido

Equipos:

- Fuente de poder para electroforesis y transferencia, soportes para los geles y accesorios, **Bio-Rad**

Reactivos:

- Membrana de PVDF y Nitrocelulosa, **Bio-Rad**
- OxyBlot™ Protein Oxidation, S7150, **Chemicon Internacional**
- Estándar de peso de proteínas, #SM0661, **Fermentas**
- Película BIOMAX MR, **Eastman Kodak Company**
- Anticuerpo primario monoclonal anti-β-actina de ratón; anticuerpo secundario contra ratón conjugado con peroxidasa; ácido deoxicólico; NaVO₃; ácido sulfosalicílico dihidratado: **Sigma Chemical Co.**
- Anticuerpo secundario contra cabra conjugado con peroxidasa: **Calbiochem**
- Tris base; glicina; acrilamida; bisacrilamida; 1,4-ditiotreitol (DTT); dodecilsulfato de sodio (SDS); cloruro de sodio (NaCl); aprotinina; leupeptina; PMSF: **Amresco**

- Albumina sérica de bovino (BSA); EDTA; Tween-20; Rojo Ponceau: **Winkler**
- Coomassie Brilliant Blue R250; ácido acético glacial, **Merck**
- Enhanced chemiluminescence (ECL); **Biological Industries**
- Metanol; **TCL**
- Leche descremada; **Nestlé**

4.4. Procesamiento de muestras sanguíneas

Las muestras de sangre del preoperatorio y postoperatorio se tomaron en tubos Vacutainer con heparina.

Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min para obtener el sedimento de los tubos heparinizados, el que se lavó 2 veces con suero fisiológico agitando suavemente y centrifugando por 10 min a 2000 rpm cada vez y agregando la tercera vez 4 volúmenes de agua destilada para producir la hemólisis. Posteriormente se alicuotó este hemolizado para su almacenamiento a -20°C.

4.5. Determinación de oxidación en carbonilación de proteínas en tejido

4.5.1. Homogenización de la muestra

La muestra de orejuela de corazón humano se pesó, y homogenizó mediante un Ultraturrax en una cantidad de RIPA (NaCl 150 mM; Tris base 10 mM; ácido deoxicólico 1%; EDTA 5 mM; SDS 0,1%; Triton-X 100 1%) proporcional a su peso más inhibidores (aprotinina 2 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 100 mM; NaVO₃ 1M), en la proporción 50 mg de tejido en 300 µL de RIPA.

4.5.2. Medición de proteínas

La cuantificación se realizó según lo descrito por Lowry³⁹, utilizando BSA como estándar. Con el BSA se construyó una curva de calibración, en donde la absorbancia de la muestra se interpoló en la curva de calibración del BSA, obteniendo así la concentración de proteínas de la muestra en µg/µL.

4.5.3. Derivatización de la muestra

Entre los distintos métodos disponibles para detectar y cuantificar la carbonilación de proteínas, se optó por realizar una derivatización del grupo carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), detectando como resultado hidrazona con un anticuerpo primario anti-DNP^{35, 36}, (Figura 2). Para esto se utilizó un kit de OxyBlot™ Protein Oxidation, S7150, que consta de DNPH, solución neutralizante (solución que reacciona deteniendo la reacción del DNPH a los grupos carbonilos) y los anticuerpos (anti-DNP y anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa).

Al formarse un semialdehído glutámico por el ataque de un radical libre en el carbono expuesto del aa se produce un posterior reordenamiento de la molécula originando un grupo carbonilo, el que no se puede medir, por lo que la carbonilación de proteínas se mide por medio de la derivatización de la muestra.

La β -actina normalmente se encuentra en la mayoría de las células, por lo que se planificó utilizarla como control de carga en la membrana en donde se realizó la carbonilación, pero no siempre se conseguía detectarla, probablemente debido a que, de acuerdo a lo informado en bibliografía, la β -actina sufre carbonilación^{40, 41} y el anticuerpo utilizado en su determinación es monoclonal y por lo tanto altamente específico para β -actina no derivatizada, y si ésta se ha oxidado sufrirá derivatización al ser expuesta a DNPH. La medida implementada para solucionar esta situación fue realizar dos membranas en paralelo, una carbonilada y otra sin carbonilar, para así visualizar la β -actina en la membrana no carbonilada y de este modo validar la metodología de carga utilizada.

Una vez obtenida la concentración de proteínas, se prepararon las muestras con un agente reductor, llevándolas a una concentración final de DTT de 50 mM, agua nanopura y la muestra homogenizada propiamente tal, quedando todas las muestras con la misma concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas.

Para la derivatización se ocuparon 5 μL y para la β -actina se ocupó todo el resto de la muestra obtenida. A los 5 μL de muestra se les agregó SDS 12% para una concentración final de 6% de SDS, luego se incubaron los tubos a T° ambiente por 10 min en oscuridad, posteriormente se adicionaron 10 μL de solución de DNPH 1X a cada uno de los tubos a derivatizar, luego se incubaron los tubos a T° ambiente por 25 min en oscuridad y se

adicionaron a cada tubo 7,5 μ L de solución neutralizante. Lo obtenido se cargó en su totalidad en el gel de poliacrilamida.

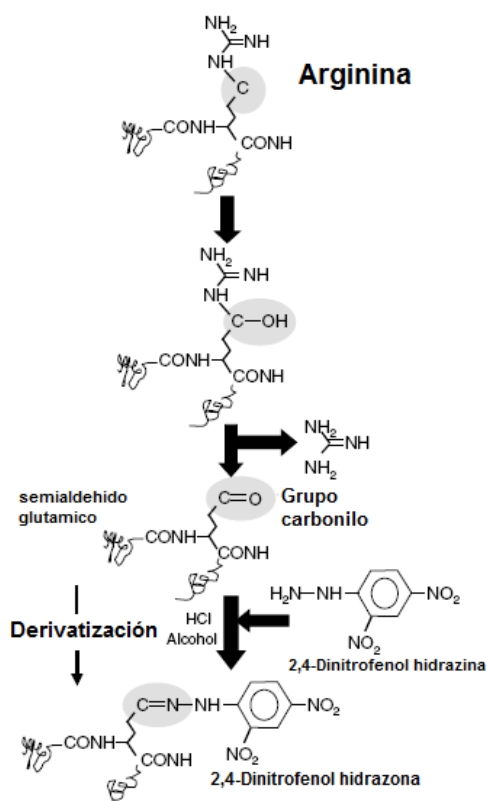


Figura 2. Carbonilación y derivatización.

Ejemplo de formación del semialdehído glutámico por el ataque de un radical libre en el carbono expuesto del aa arginina, y posterior reordenamiento de la molécula originando un grupo carbonilo, el que no se puede medir. Por lo tanto, el semialdehído glutámico se derivatiza con DNPH, obteniéndose 2,4-dinitrofenol hidrazona, la que se puede cuantificar por un anticuerpo específico. (Adaptado de Nystrom et al ³⁶)

4.5.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%. Para la detección se cargaron 10 μ g de extracto proteico. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 70 V en tampón de electroforesis 1X (Tris base 0,25 M, glicina 1,9 M, SDS 1%).

4.5.5. Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PDVF y nitrocelulosa a 350 mA durante 120 min en tampón de transferencia (Glicina 0,192 M, Tris base 25 mM, Metanol 10%).

4.5.6. Western blot

Detección de proteínas carboniladas:

Una vez transferida, la membrana se bloqueó con tampón de bloqueo (TBS 1X; Tween-20 0,1%; BSA 3% p/v) durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario correspondiente según ensayo (anti-DNP) en tampón de incubación BSA (TBS 1X; Tween-20 0,1%, BSA 3% p/v) a una dilución 1:2.000, durante 1 h a temperatura ambiente.

Detección de β -actina:

La membrana se bloqueó con tampón de bloqueo (TBS 1X; Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v) durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (β -actina, como control de carga), en tampón de incubación con leche descremada a una dilución 1:5.000 por 2 h a temperatura ambiente con agitación suave.

Con posterioridad a la incubación, las membranas, tanto de proteínas carboniladas como de β -actina, se lavaron 3 veces por 10 min en TBS 1X / Tween-20 al 0,1% y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa a un título de 1:10.000 para β -actina y con anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa a un título de 1:2.000 durante 1 h para proteínas carboniladas, en ambos casos en tampón de incubación con BSA. Para la detección de las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en solución de ECL y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax. La membrana de nitrocelulosa para β -actina se tiñó en una solución de rojo Ponceau (rojo Ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) y la membrana de PVDF se tiñó en una solución de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R250 0,01 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %) para poder digitalizarlas. Las películas se digitalizaron y las imágenes fueron sometidas a densitometría con ayuda de los programas computacionales Adobe Photoshop CS2 y Quantity One.

Dado que todas las proteínas son susceptibles de carbonilarse, se cuantificó el carril completo, lo que implica que, a diferencia de otros casos, no es sólo una banda en particular la que debe cuantificarse.

4.6. Determinación de parámetros bioquímicos de estrés oxidativo a nivel sistémico

4.6.1. Determinación de actividad sistémica de superóxido dismutasa eritrocitaria

La extracción de la superóxido dismutasa (SOD) se realizó desde el hemolizado. A una alícuota de 1 mL del hemolizado se le agregó 250 μ L de etanol y 150 μ L de cloroformo frío. La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 min a 4°C, luego se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min a 4°C y se separó el sobrenadante, que contenía la SOD ⁴². Este sobrenadante se almacenó a -20°C para su posterior análisis enzimático.

El método se basa en la inhibición de la autooxidación, en medio alcalino, de adrenalina a adenocromo. Se siguió la formación de adenocromo por espectrofotometría a 480 nm y a una temperatura de 30°C ⁴³.

Para obtener la autooxidación basal de epinefrina, se midió cinéticamente la autooxidación de 50 μ L de adrenalina (90 mM, pH 2,0) en 950 μ L de amortiguador glicina (50 mM, pH 10,2). Para obtener los resultados se construyó una curva de calibración a partir de una solución de SOD estándar de 2 U/mL, para lo cual se agregó 50 μ L de adrenalina (90 mM, pH 2,0) a un volumen decreciente de buffer glicina (50 mM, pH 10,2), y un volumen creciente de una solución de SOD estándar de 2 U/mL, de modo de obtener concentraciones finales de 0,1 a 0,5 U/ mL de SOD en un volumen final de 1 mL.

De cada concentración se obtuvo el porcentaje de inhibición restando la pendiente de la zona recta de la curva respectiva a la de la curva basal, y transformando este resultado en porcentaje de inhibición con respecto a la pendiente basal. Posteriormente se construyó la curva de los recíprocos, es decir; 1/(porcentaje de inhibición) v/s 1/(unidades de superóxido dismutasa), la que resultó en una recta en la cual se interpolaron los recíprocos de los porcentajes de inhibición obtenidos con cada muestra, a los que se les hizo posteriormente la transformación matemática inversa para obtener el valor de superóxido dismutasa correspondiente, el que se expresó en unidades de superóxido dismutasa/ mg de hemoglobina.

4.6.2. Determinación de actividad sistémica de catalasa

Se basa en medir cinéticamente la degradación de H_2O_2 por la catalasa presente en la muestra a una longitud de onda de 240 nm. Para ello se preparó una dilución 1:10 del hemolizado con agua destilada, y 20 μ L de esta solución se llevaron a un volumen de 2 mL con amortiguador fosfato (50 mM, pH 7,0) en una cubeta de cuarzo de 3 mL. La reacción se inició con la adición de 1 mL de H_2O_2 30 mM. Se utilizó un blanco, el que sólo careció de H_2O_2 ⁴⁴. Para obtener el contenido de catalasa de las muestras, se multiplicó el valor obtenido por el factor de dilución y se expresó en unidades de catalasa/ mg de hemoglobina.

4.7. Análisis estadístico

Para la comparación de los parámetros contemplados en la caracterización de pacientes se realizó el análisis estadístico utilizando el test de chi-cuadrado (χ^2) de 2 colas con los grados de libertad (gl) correspondientes para las variables no continuas, y para las variables continuas se utilizó el t-test. Las actividades de SOD eritrocitaria y catalasa se expresaron como promedio con su respectiva desviación estándar y las comparaciones se realizaron por medio de t-test para muestras paramétricas y no pareadas según el caso. El análisis estadístico para medir el grado carbonilación se realizó comparando los pixeles obtenidos por medio del escaneo de las membranas y se efectuó en el programa de GraphPad Prism 5, aplicando t-test para muestras paramétricas no pareadas o pareadas según el caso. Los resultados se expresaron como promedio con su correspondiente desviación estándar. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa con un $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Caracterización de los pacientes

5.1.1. Distribución de pacientes y características antropométricas

El reclutamiento de los pacientes en el INT comenzó en Junio del 2008 y concluyó en Noviembre del mismo año. En este periodo se reclutaron 60 pacientes (12 de los cuales se retiraron por diferentes razones, entre ellas, suspensión de la cirugía, desistirse de la segunda toma de muestras, imposibilidad de tomar la cantidad de muestra programada) quedando 48 pacientes. En el HCUC el periodo de reclutamiento fue mucho más prolongado, comenzando el 2007 y concluyendo el 2008, y la cantidad de pacientes reclutados a los que fue posible tomarles muestra de tejido cardiaco durante la cirugía fue de 66.

De esta forma entre ambos centros asistenciales se reclutó un total de 114 pacientes. Tal como se muestra en la Tabla 2, se observa una mayor proporción de pacientes de sexo masculino con un 82%, global, y una proporción por hospital muy cercana a este índice, sin diferencia entre ambos centros.

Tabla 2. Distribución de pacientes según hospital y sexo.

Las columnas muestran el número de pacientes para el HCUC y el INT, mientras que las filas determinan la cantidad de pacientes según sexo. Los valores incluidos entre paréntesis corresponden al porcentaje de los totales parciales de cada columna. El porcentaje de pacientes es de 83% en el HCUC y de 81% en el INT. Esta diferencia no es significativa. HCUC: Hospital Clínico de la Universidad Católica. INT: Instituto Nacional del Tórax.

Sexo	HCUC	INT	Ambos Hospitales
Hombres	55 (83%)	39 (81%)	94 (82%)
Mujeres	11 (17%)	9 (19%)	20 (18%)
Total	66 (100%)	48 (100%)	114 (100%)

$\chi^2 = 0.08338$

g.l.=1

Dos colas

p= 0,7728

La tabla 3 muestra la tasa de ocurrencia de fibrilación auricular postoperatoria global y en cada uno de los centros asistenciales participantes. En el HCUC 22 pacientes de 66 desarrollaron FA, correspondiendo al 33,3%, y en el INT 9 de 39 desarrollaron la

complicación, lo que equivale al 19%. En forma global, 31 pacientes de 114 desarrollaron fibrilación auricular postoperatoria, lo que equivale al 27%.

Tabla 3. Ocurrencia de FA post-operatoria.

Las columnas muestran el porcentaje de pacientes para el HCUC y el INT, mientras que las filas determinan los pacientes que desarrollan FA o no, después de la cirugía. Los valores incluidos entre paréntesis corresponden al número de pacientes participantes. La proporción de pacientes que desarrolló FA postoperatoria en el HCUC es de 33%, mientras en el INT esta proporción es menor, de 19%, promediando ambos grupos un 27%. FA: Fibrilación auricular. HCUC: Hospital Clínico de la Universidad Católica. INT: Instituto Nacional del Tórax.

	HCUC	INT	Ambos Hospitales
Pacientes sin FA postoperatoria	67% (45)	81% (39)	73% (84)
Pacientes con FA postoperatoria	33% (21)	19% (9)	27% (30)
Todos los pacientes	100% (66)	100% (48)	100% (114)

El promedio de edad global de los pacientes fue de 62.0 ± 11.1 años. En la Tabla 4 se muestra la edad de los pacientes de acuerdo a si desarrollaron FA después de la cirugía, agrupados por centro asistencial. La edad promedio de los 31 pacientes que presentaron FA después de cirugía fue de 68.7 ± 8.2 años y en los 83 pacientes que no la presentaron fue de 59.4 ± 11.0 años y, arrojando significación estadística ($p < 0,0001$).

Tabla 4. Promedio de edad de acuerdo a aparición de FA postoperatoria.

Las columnas muestran la edad promedio de pacientes del HCUC y el INT, mientras que las filas determina los pacientes que desarrollan FA después de la cirugía y los que no la presentan. Los valores incluidos entre paréntesis, corresponde al número de pacientes. DS: Desviación estándar. POAF: Fibrilación auricular postoperatoria. HCUC: hospital clínico de la Universidad Católica. INT: Instituto Nacional del Tórax.

	Edad Promedio \pm DS		
	HCUC	INT	Ambos Hospitales
Pacientes sin POAF	58.2 ± 11.4 (45)	60.7 ± 10.6 (39)	59.4 ± 11.0 (84)
Pacientes con POAF	68.5 ± 8.8 (21)	69.2 ± 7.1 (9)	68.7 ± 8.2 (30)
Todos los pacientes	61.7 ± 11.6 (66)	62.3 ± 10.5 (48)	62.0 ± 11.1 (114)

t-test, paramétrico, no pareado

$p < 0.0001$

Los datos de estatura, peso e IMC sólo fueron reunidos en el INT (Tabla 5). Al comparar los pacientes que desarrollaron FA después de cirugía con los que no la desarrollaron, se encontró una diferencia significativa en cuanto al IMC. Ambos grupos de pacientes tienen valores ≥ 25 (indicador de sobrepeso), pero los pacientes que no desarrollaron FA, presentaron un valor de IMC de $28,20 \pm 3,11$, mayor a los pacientes que desarrollan FA después de la cirugía, los que presentaron un IMC promedio de $25,51 \pm 3,55$ ($p < 0,05$).

Tabla 5. Aparición de fibrilación auricular postoperatoria según estatura, peso e IMC, en el INT.

Las columnas muestran el promedio y la DS en cuanto a si los pacientes experimentaron FA postoperatoria o no, mientras que las filas determinan los parámetros de peso, talla e IMC. El IMC fue calculado utilizando la fórmula peso/estatura². DS: Desviación estándar. FA: Fibrilación auricular.

Parámetros	Promedio \pm DS		
	Pacientes sin FA postoperatoria	Pacientes con FA postoperatoria	Todos los pacientes
Peso (Kg)	76,71 \pm 11,33	70,11 \pm 12,93	75,48 \pm 11,79
Estatura (m)	1,65 \pm 0,09	1,65 \pm 0,09	1,65 \pm 0,09
IMC (Kg/m²)	28,20 \pm 3,11	25,51 \pm 3,55	27,70 \pm 3,33

t-test, paramétrico, no pareado

p < 0.05

5.1.2. Diagnósticos concomitantes y terapias farmacológicas

Los pacientes estudiados tuvieron diagnóstico de hipertensión arterial en un 77% (88 pacientes), diabetes mellitus en un 58% (54 pacientes) y dislipidemia en un 47% (66 pacientes).

Tabla 6. Prevalencia de patologías concomitantes.

La prevalencia de HTA en nuestros pacientes alcanzó a un 77%, la de DM a un 58% y la de dislipidemia a un 47%. Los valores entre paréntesis corresponden al número de pacientes participantes. HTA: hipertensión arterial. DM: diabetes mellitus.

Patologías	Porcentaje (n=114)
HTA	77% (88)
Dislipidemia	47% (54)
DM	58% (66)

La prevalencia de patologías cardiovasculares concomitantes en los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 6.

En cuanto a la relación de enfermedades concomitantes y la presencia o ausencia de FA luego de la cirugía, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia o ausencia de HTA, de dislipidemia, ni de DM, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Relación de enfermedades concomitantes con ocurrencia de FA postoperatoria.

Al analizar la ocurrencia de FA postoperatoria de acuerdo a la presencia de patologías concomitantes, no se encontró ninguna diferencia significativa entre los grupos. HTA: hipertensión arterial. DM: diabetes mellitus. FA: fibrilación auricular. χ^2 : test chi-cuadrado. g.l.= grados de libertad.

		FA (n=114)		p	χ^2
		Presente	Ausente		
Hipertensión	Si	23 (20%)	65 (57%)	0.6409	0.2176
	No	8 (7%)	18 (16%)		
Dislipidemia	Si	16 (14%)	50 (44%)	0.4064	0.6893
	No	15 (13%)	33 (29%)		
Diabetes mellitus	Si	13 (11%)	41 (36%)	0.4777	0.5041
	No	18 (16%)	42 (37%)		

Análisis estadístico de χ^2

g.l.=1

Dos colas

Se realizó también un registro del uso de terapia medicamentosa previo a la cirugía en donde hubo un alto porcentaje de consumo de medicamentos cardiovasculares, destacando el ácido acetilsalicílico con un 79% (89 pacientes), seguido en forma decreciente por otros medicamentos como estatinas 75% (84 pacientes), bloqueadores β

adrenérgicos 71% (80 pacientes) e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II 64% (71 pacientes), como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Uso de medicamentos antes de la cirugía.

Muestra la tasa de utilización de medicamentos cardiovasculares por parte de los pacientes antes de realizarse la cirugía. El medicamento más consumido en este grupo de pacientes es al AAS con un 79%, seguido de las estatinas con un 75%, bloqueadores beta adrenérgicos con un 71%, y con un menor porcentaje los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II con un 64%, los valores entre paréntesis corresponden al número de pacientes. AAS: ácido acetilsalicílico. ECA: enzima convertidora de angiotensina II. β bloqueadores: bloqueadores beta adrenérgicos. FA: fibrilación auricular.

Medicamentos	Porcentaje
AAS	79% (89)
Estatinas	75% (84)
β bloqueadores	71% (80)
Inhibidores de la ECA	64% (71)

En cuanto a la relación de uso de medicamentos cardiovasculares consumidos previo a la cirugía y la presencia o ausencia de FA luego de la cirugía, se analizó la utilización de ácido acetilsalicílico, estatinas, bloqueadores β adrenérgicos e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre su uso y la presencia o ausencia de FA para ninguno de ellos, como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Relación de consumo de medicamentos con ocurrencia de FA postoperatoria. El análisis estadístico de chi-cuadrado no mostró ninguna diferencia significativa entre las tasas de utilización de medicamentos entre pacientes que desarrollaron o no FA postoperatoria. AAS: ácido acetilsalicílico. χ^2 : test chi-cuadrado. ECA: enzima convertidora de angiotensina II. β bloqueadores: bloqueadores beta adrenérgicos. FA: fibrilación auricular. g.l.= grados de libertad.

		FA (n=112)		p	χ^2
		Presente	Ausente		
Inhibidores de la ECA	Si	18 (16%)	53 (47%)	0.8635	0.0296
	No	11(10%)	30 (27%)		
β bloqueadores	Si	19 (17%)	61 (54%)	0.4130	0.6700
	No	10 (9%)	22 (20%)		
Estatinas	Si	21 (19%)	63 (56%)	0.7087	0.1396
	No	8 (7%)	20 (18%)		
AAS	Si	21(19%)	68 (61%)	0.2749	1.1920
	No	8 (7%)	15 (13%)		

Análisis estadístico de χ^2

g.l=1

Dos colas

5.2. Niveles de carbonilación de proteínas en tejido auricular

5.2.1. Estandarización de la técnica de determinación de oxidación de proteínas

Se comenzó probando el kit OxyBlot™ Protein Oxidation, S7150 en tejido de corazón de rata, para luego pasar a tejido de aurícula humana. Una de las muestras humanas disponibles fue utilizada como control interno, y con este control se probó la técnica con distintas concentraciones de proteínas (5 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg, 25 µg) de aurícula humana y con el tejido de rata (Figura 3).

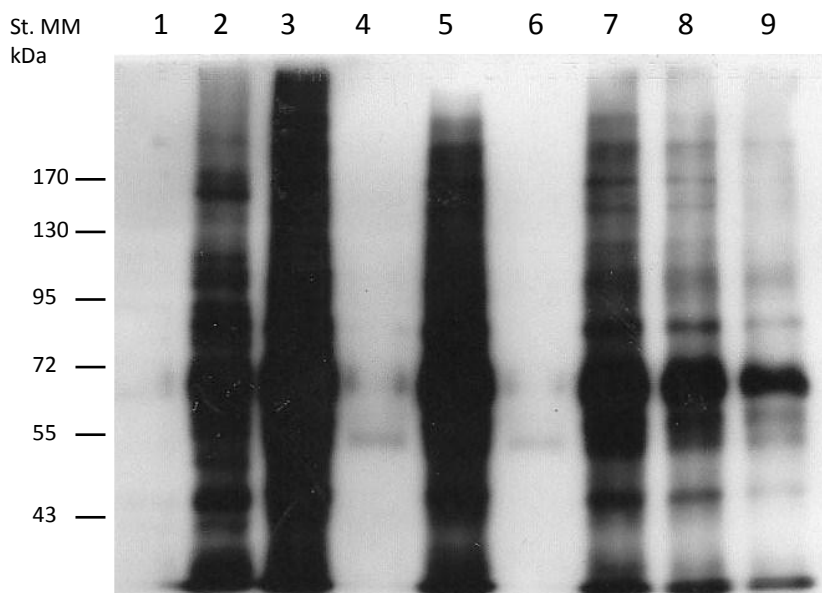


Figura 3. Film fotográfico representativo de carbonilación de proteínas del estándar interno.

El carril 1: tejido cardíaco de rata no derivatizado; carril 2: tejido cardíaco de rata derivatizado; carril 3: tejido auricular humano, en una concentración de 25 µg, derivatizado; carril 4: tejido auricular humano, en una concentración de 20 µg, no derivatizado; carril 5: tejido auricular humano, en una concentración de 20 µg, derivatizado; carril 6: tejido auricular humano, en una concentración de 15 µg, no derivatizado; carril 7: tejido auricular humano, en una concentración de 15 µg, derivatizado; carril 8: tejido auricular humano, en una concentración de 10 µg, derivatizado; carril 9: tejido auricular humano, en una concentración de 5 µg, derivatizado. Las muestras fueron cargadas en orden decreciente de concentración, lo que coincide con la intensidad de la señal, lo que significa que a medida que hay una mayor concentración de proteínas mayor es la intensidad de la señal. Las muestras 15 µg y 20 µg, fueron cargadas dos veces, una derivatizada y la otra no derivatizada (no derivatizada: falso negativo).

Además, se corrieron muestras sin derivatizar como falsos negativos, con lo que se puede verificar la selectividad del anticuerpo primario anti-DNP, y de esta forma estar seguros que lo que se está midiendo son solamente los grupos carbonilos.

En la misma membrana se procedió posteriormente a realizar un control de carga determinando la β -actina en un nuevo film (Figura 4). En ella se puede corroborar que todos los carriles fueron cargados pues aparece la banda de la β -actina en todas las muestras humanas, y que la falta de bandeado en 2 de los carriles de la Figura 3, no se debe a que no se haya sembrado la muestra, sino a que se trató de muestra no derivatizada.

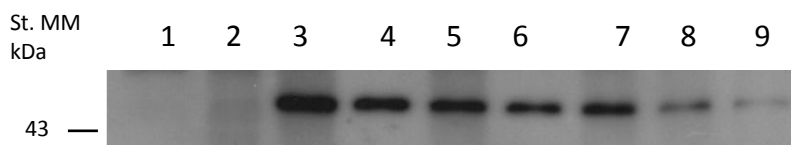


Figura 4. Film fotográfico de β -actina.

El carril 1: tejido cardiaco de rata no derivatizado; carril 2: tejido cardiaco de rata derivatizado; carril 3: tejido auricular humano, en una concentración de 25 μ g, derivatizado; carril 4: tejido auricular humano, en una concentración de 20 μ g, no derivatizado; carril 5: tejido auricular humano, en una concentración de 20 μ g, derivatizado; carril 6: tejido auricular humano, en una concentración de 15 μ g, no derivatizado; carril 7: tejido auricular humano, en una concentración de 15 μ g, derivatizado; carril 8: tejido auricular humano, en una concentración de 10 μ g, derivatizado; carril 9: tejido auricular humano, en una concentración de 5 μ g, derivatizado. Corresponde a un film obtenido de la misma membrana de la Figura. 3, en donde, después de deshibridizar la membrana, se le agrega anticuerpo de β -actina, sirviendo de esta manera como control de carga.

Para determinar la mejor concentración de trabajo (Figura 5), se graficó pixeles totales vs concentración de proteínas, y se determinó que la mejor relación pixeles/concentración se logró a 10 μ g y 15 μ g, obteniendo una buena intensidad de señal, fácilmente medible, y observando a concentraciones más altas (25 y 20 μ g) una saturación de las bandas. Entonces se procede con las muestras de pacientes. Se escogió trabajar con la concentración de 10 μ g debido a que de este modo las muestras con poca cantidad de proteínas podían ser medidas de mejor forma.

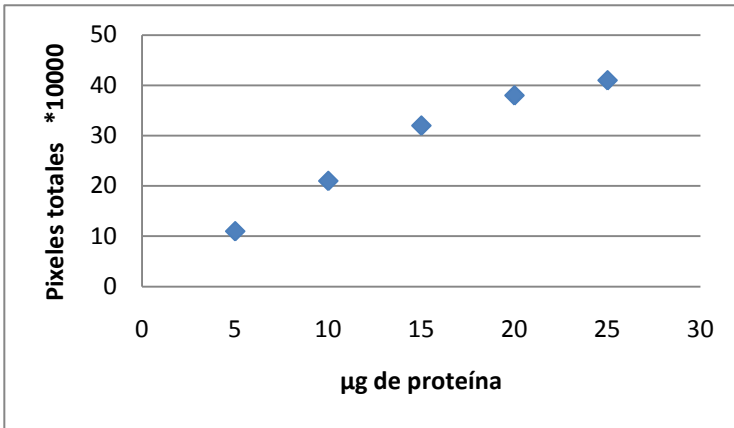


Figura 5. Gráfico de la estandarización de carbonilación de proteínas.

Se logra obtener este gráfico midiendo los píxeles totales del bandeo vs la concentración de proteínas de la figura 3. La concentración de trabajo elegida fue 10 µg de proteína.

5.2.2. Determinación de estrés oxidativo local (en apéndice de corazón)

Una vez obtenida la estandarización de la técnica se procedió a realizar la determinación en las 66 muestras de aurícula de los pacientes del HCUC. Como puede verse en la figura 6, en las membranas se corrieron muestras de pacientes con y sin FA postoperatoria, los pacientes con FA presentan una mayor intensidad de la señal como el carril 3, 4 y 6.

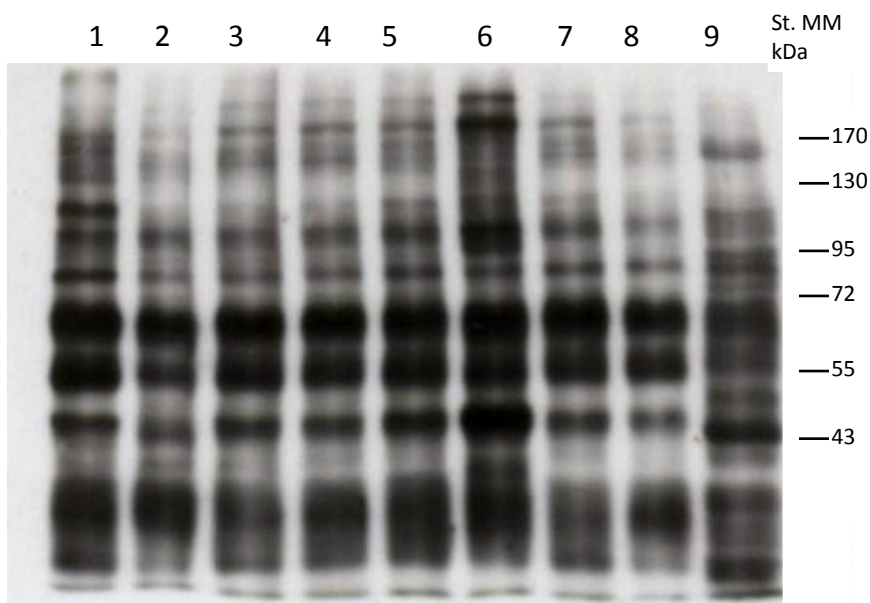


Figura 6. Film fotográfico de carbonilación de proteínas representativo de una muestra de pacientes.

El carril 1: paciente 5026; carril 2: paciente 5070; carril 3: paciente 5136 experimenta FA postoperatoria; carril 4: paciente 5207 experimenta FA postoperatoria; carril 5: paciente 5028; carril 6: paciente 5052 experimenta FA postoperatoria; carril 7: paciente 5023; carril 8: paciente 5194; carril 9: estándar interno. La cuantificación se realiza sobre el total de bandas que aparecen en cada carril.

En la Figura 7 se muestra la tinción de la membrana con solución de azul de Coomassie, de donde se obtiene la concentración total de μg de proteínas cargadas.

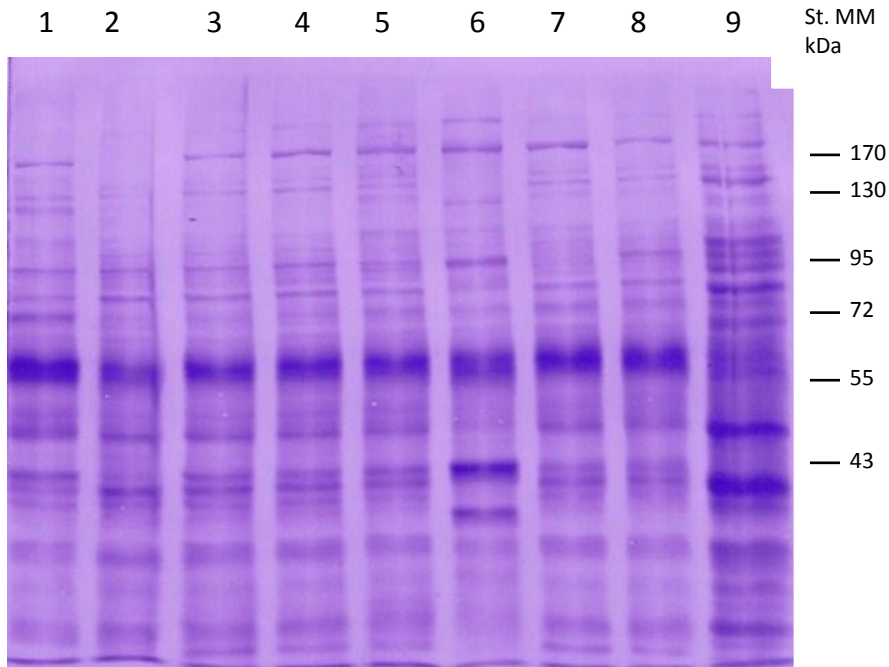


Figura 7. Tinción con solución de azul de Coomassie.

El carril 1: paciente 5026; carril 2: paciente 5070; carril 3: paciente 5136 experimenta FA postoperatoria; carril 4: paciente 5207 experimenta FA postoperatoria; carril 5: paciente 5028; carril 6: paciente 5052 experimenta FA postoperatoria; carril 7: paciente 5023; carril 8: paciente 5194; carril 9: estándar interno. Esto es la tinción de la membrana con solución de azul de Coomassie de los mismos pacientes mostrados anteriormente en la Figura 5.

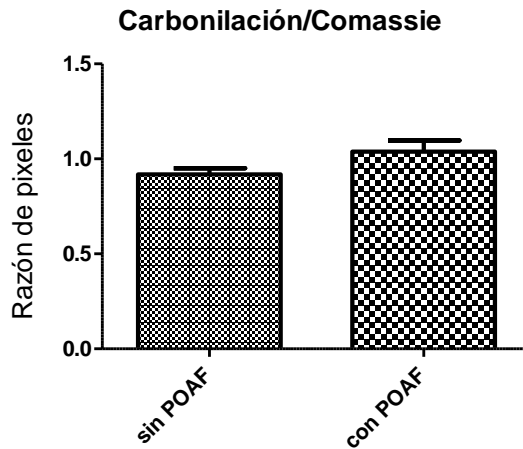
Para poder hacer comparables los resultados obtenidos en los diferentes film, se usó como control interno la misma muestra utilizada para la estandarización, a la que asignó arbitrariamente el valor de 1, y con este valor se corrigieron todos los demás pacientes. Para obtener los datos de carbonilación se pixeleó el carril completo, y se corrigió este dato contra el pixeleo también completo del carril con la tinción de Coomassie, obteniendo así el valor corregido de la carbonilación. Este estándar interno se usó en todos los geles.

5.2.2.1 Resultados de la carbonilación de proteínas cardiacas

Los pacientes que no desarrollaron FA postoperatoria tuvieron un promedio de $0,92 \pm 0,22$ razones de pixeles, y los que sí desarrollaron FA postoperatoria un promedio de $1,04 \pm 0,27$ razones de pixeles. Esto representa un aumento del 13,05% en el nivel de carbonilación, en los pacientes que experimentan FA en el postoperatorio con respecto a los que no. Sin embargo, entre ambos grupos de pacientes no hay una diferencia

estadísticamente significativa ($p= 0,059$). En la Figura. 8 (a) se muestra en el eje vertical la razón de pixeles y en el eje horizontal los pacientes según si desarrollan FA después de la cirugía o no.

(a)



(b)

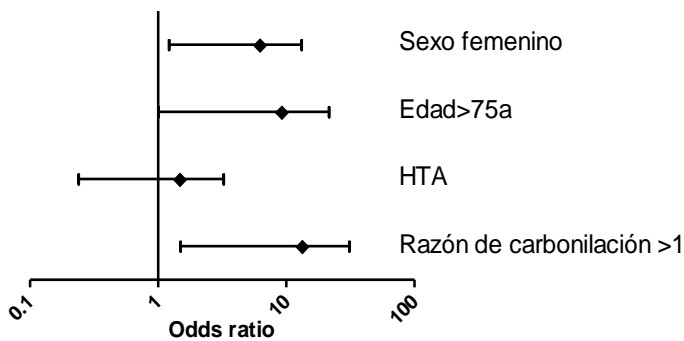


Figura 8. Resultados de la carbonilación de proteínas en pacientes.

(a) Comparación de los niveles de carbonilación en razón de pixeles de los tejidos auriculares de los pacientes sin POAF ($n=45$) y con POAF ($n=21$) (b) Se muestra odds ratio y el intervalo de confianza (IC) de los valores obtenidos en el gráfico, corrigiendo por el sexo, la edad, HTA, y la razón de carbonilación. POAF: Fibrilación auricular post-operatoria. HTA: Hipertensión arterial.

En la Figura 8 (b) se muestra el odds ratio, es decir, la probabilidad de ocurrencia de POAF con respecto a la presencia de las respectivas variables explicatorias y el intervalo de confianza (IC) para la estimación del riesgo. Las mujeres tienen mayor posibilidad de desarrollar FA (IC= 1,50- 31,10), como también las personas mayores de 75 años (IC=

1,01- 21,60). La HTA presenta un valor de odds ratio cercano a 1 (IC= 0,24 - 3,25) por lo que no representaría un mayor riesgo para que los pacientes desarrollen FA. Los valores mayores a 1 en la razón de carbonilación (IC= 1,22- 13,22), constituirían también un factor de riesgo relevante.

5.3. Determinación de estrés oxidativo sistémico

5.3.1. Relación de actividad de SOD con ocurrencia de FA postoperatoria

Los pacientes sin fibrilación auricular postoperatoria presentan una actividad enzimática promedio prequirúrgica de SOD eritrocitaria de $0,60 \pm 0,25$ U/g Hb y un promedio postoperatorio de $0,65 \pm 0,26$ U/g Hb. Por otra parte, los pacientes con fibrilación auricular postoperatoria presentan en el preoperatorio un promedio de $0,59 \pm 0,23$ U/g Hb; y en el postoperatorio un promedio de $0,76 \pm 0,44$ U/g Hb.

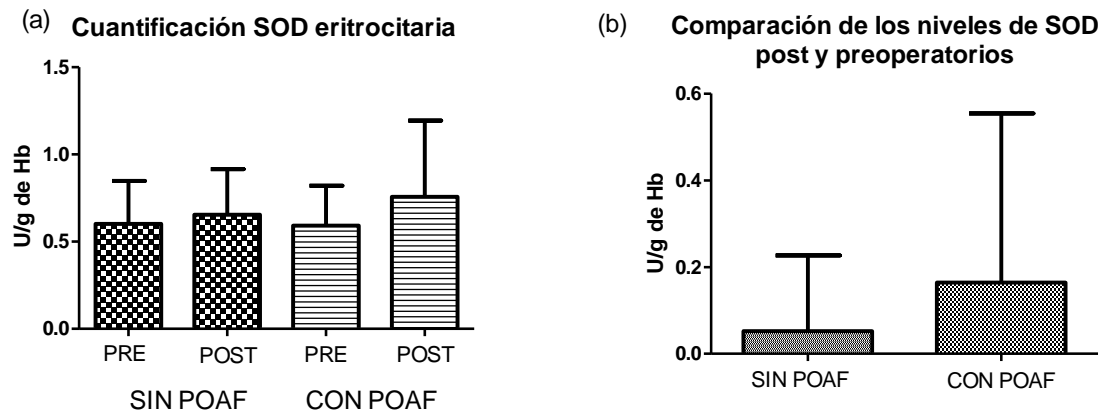


Figura 9. Actividad de la enzima SOD eritrocitaria.

n total = 94, n sin POAF = 71, n con POAF = 23. (a) No hay diferencia significativa en los niveles prequirúrgicos ni postquirúrgicos de actividad de SOD eritrocitaria entre ambos grupos. No hay diferencia significativa en el aumento de la actividad de SOD eritrocitaria provocada por la cirugía entre ambos grupos de pacientes. No hay diferencias significativas entre los niveles pre y postquirúrgicos en ambos grupos de pacientes. (b) corresponde a la resta de los valores de la SOD eritrocitaria postoperatoria menos preoperatoria; no hay una diferencia significativa entre ambos grupos, pero es cercano a la significancia. SOD: Superóxido dismutasa. Hb: hemoglobina; g: gramo; POST: postoperatorio; PRE: preoperatorio; POAF: fibrilación auricular; postoperatoria. t-test para muestra pareadas paramétricas o para muestras no pareadas paramétricas según el caso.

Según la Figura 9 (a), en forma conjunta se observa en ambos grupos de pacientes un leve aumento de la SOD eritrocitaria luego de la cirugía con respecto a los valores prequirúrgicos y aunque en ninguno de los grupos de pacientes hay una diferencia estadísticamente significativa entre los valores pre y postoperatorios, se observó una tendencia a un mayor aumento de la actividad de la SOD en pacientes con fibrilación auricular postoperatoria en comparación con los que no la experimentaron. Los resultados obtenidos de la Figura 9 (b) corresponden a la variación de la actividad enzimática de SOD eritrocitaria entre el pre y postoperatorio, presentando los pacientes sin fibrilación auricular postoperatoria un promedio de $0,05 \pm 0,17$ U/g Hb y los pacientes con fibrilación auricular postoperatoria un promedio de $0,16 \pm 0,38$ U/g Hb. La diferencia de la variación de actividad de SOD entre ambos grupos de pacientes no es estadísticamente significativa pero está muy cerca de serlo ($p=0,058$).

5.3.2. Relación de actividad de Catalasa con ocurrencia de FA postoperatoria

Los pacientes sin fibrilación auricular postoperatoria en el preoperatorio presentan una actividad enzimática de catalasa promedio de $51,95 \pm 14,48$ U/g Hb y un promedio postoperatorio de $59,74 \pm 14,33$ U/g Hb. Por otra parte, los pacientes con fibrilación auricular postoperatoria en el preoperatorio presentan un promedio de $52,56 \pm 14,71$ U/g Hb; y en el postoperatorio un promedio de $59,64 \pm 18,85$ U/g Hb. Según la Figura 10, los valores preoperatorios de los pacientes con y sin fibrilación auricular postoperatoria son muy similares y los valores postoperatorios de los pacientes con y sin fibrilación auricular postoperatoria también lo son. Después de realizada la cirugía hay un leve aumento de la catalasa en ambos grupos de pacientes.

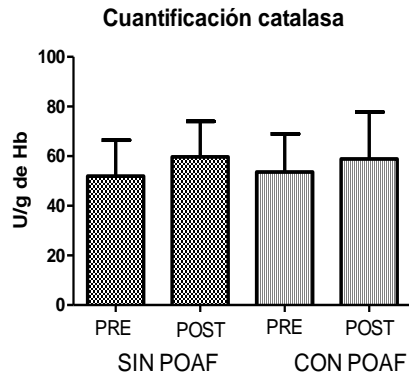


Figura 10. Actividad de la enzima catalasa.

n total = 95, n sin POAF = 69, n con POAF = 26. No hay diferencia significativa en los niveles prequirúrgicos ni postquirúrgicos de actividad de catalasa entre ambos grupos. No hay diferencia significativa en el aumento de la actividad de catalasa provocada por la cirugía entre ambos grupos de pacientes. No hay diferencias significativas entre los niveles pre y postquirúrgicos en ambos grupos de pacientes. Hb: hemoglobina; g: gramo; POST: postoperatorio; PRE: preoperatorio; POAF: fibrilación auricular postoperatorio. t-test para muestra pareadas paramétricas o para muestras no pareadas paramétricas según el caso.

6. Discusión

La fibrilación auricular es la arritmia cardíaca más frecuente en la práctica clínica ⁶, y a menudo coexiste con condiciones médicas que favorecen su aparición. En particular puede ser común después de una cirugía, especialmente después de operaciones cardioráxicas como la cirugía de revascularización miocárdica, afectando la calidad de vida del paciente, prolongando la estancia hospitalaria y elevando los costos de atención ^{6, 12} en comparación con quienes no presentan FA postoperatoria. La FA está asociada con una alta incidencia de complicaciones, como por ejemplo insuficiencia cardíaca congestiva, accidentes cerebrovasculares, disfunción renal, infecciones y discapacidad neurocognitiva ^{12, 45}.

Para la caracterización clínica que se realizó con los pacientes se consideraron distintos factores de riesgo cardiovascular (como hipertensión arterial, dislipidemia y diabetes mellitus); factores demográficos (sexo, edad promedio, índice de masa corporal), y consumo de medicamentos antes de la cirugía (ácido acetilsalicílico, inhibidores de la ECA, estatinas, β -bloqueadores). La mayoría de los pacientes (82%) resultó ser de sexo masculino al igual que en estudios previos similares ^{32, 46}, concordando además con datos chilenos respecto de riesgo cardiovascular el cual suele ser elevado en una mayor proporción de hombres (64,2%) que de mujeres (46,2%) ³.

La edad resultó ser un claro predictor de sufrir FA en nuestros pacientes, confirmando antecedentes previos ⁶. En nuestra población los pacientes que presentan fibrilación postoperatoria tienen una edad promedio 10 años más elevada (59 años) que los que no presentaron esta complicación (69 años), arrojando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$). Según se ha descrito previamente, la incidencia y prevalencia de fibrilación auricular aumentan progresivamente con la edad (Figura 11) y aproximadamente el 50% de los pacientes con FA son de 75 años o más ⁴⁷.

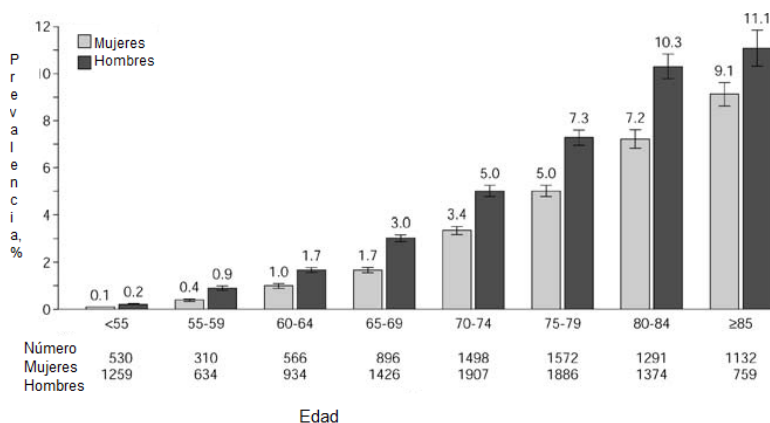


Figura 11. Prevalencia de fibrilación auricular por edad y sexo en Estados Unidos ⁴⁸

En el gráfico se aprecia una mayor prevalencia de FA en pacientes según tienen una edad más avanzada, con un aumento más tardío en mujeres que en hombres.

Según lo descrito en la figura 8 (b), página 41, las mujeres presentan un odds-ratio más elevado en relación a FA y por lo tanto tienen mayor posibilidad de desarrollarla. Según se ha descrito previamente, las mujeres son más propensas a experimentar ataques, recidivas y aumentos de la frecuencia cardíaca durante la FA y una explicación podría ser el efecto que las fluctuaciones hormonales femeninas ejercerían en ellas ⁴⁹.

En cuanto al IMC de los pacientes, los que presentaron FA muestran un promedio más bajo (25,5) que los que no la presentaron (28,2) y aunque esta diferencia es significativa, ambos grupos de pacientes se encuentran en rango de sobrepeso con respecto a su estado nutricional (IMC de 18 a 24,9) ³. El hecho de que los pacientes que presentan FA muestren un IMC promedio menor que los que no presentan FA se contradice con lo descrito previamente en bibliografía, ya que el sobrepeso y la obesidad se han considerado factores de riesgo, que favorecen la aparición de FA ^{50, 51}.

Las patologías concomitantes consideradas para el análisis son las que han sido identificadas previamente como factores de riesgo cardiovascular. La prevalencia de estas patologías en nuestros pacientes fue de 77% para la HTA, 47% para dislipidemia, y 58% para DM. La prevalencia de estas enfermedades también ha sido analizada en otros estudios con porcentajes menores en cuanto a la HTA (50-70%), la dislipidemia en rangos que comprenden el valor descrito en este estudio y la DM resultó más elevada en

nuestros pacientes que lo descrito previamente (39-49%)^{32, 46} Una posible explicación para esta mayor tendencia a tasas más elevadas de los factores de riesgo cardiovascular es que nuestros pacientes son exclusivamente pacientes coronarios, en cambio otros estudios han incluido pacientes sometidos a cirugía valvular, los cuales probablemente concurren con menor riesgo cardiovascular global.

Los pacientes reclutados para nuestro estudio muestran un alto consumo de medicamentos con potencial preventivo de FA: β -bloqueadores, estatinas e inhibidores de la ECA. Ninguno de ellos presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto a su tasa de utilización entre pacientes que presentaron FA y los que no. Ello puede deberse a que no se recopiló el dato de por cuánto tiempo han sido consumidos estos medicamentos antes de la cirugía, y por lo tanto no se consideró para los análisis. A las estatinas se les describe propiedades hipocolesterolémicas, antioxidantes y antiinflamatorias, y varios estudios argumentan su potencial de protección cardiovascular⁶. En los pacientes que se someten a cirugía coronaria, el consumo de estatinas antes de la cirugía ha disminuido la incidencia de FA^{46, 52}. Recientemente un meta-análisis de 3.000 pacientes mostró que los pacientes que consumen estatinas antes de la cirugía (24,9%) tienen un porcentaje menor de incidencia de desarrollar FA después de la cirugía, que quienes no consumían estatinas (29,3%)⁵³. En cambio en nuestro estudio no se observa una diferencia significativa, quizás debido a que el consumo de estos medicamentos es de un 77% en toda la población estudiada, un porcentaje bastante alto que dificulta el que una eventual diferencia se manifieste.

Los inhibidores de la ECA disminuirían significativamente la incidencia de FA según la bibliografía^{54, 55}, describiéndose estudios experimentales y clínicos que han demostrado que ellos y los antagonistas de los receptores de angiotensina II pueden disminuir la incidencia de FA. Los inhibidores de la ECA reducen la presión en la aurícula, reducen la frecuencia de los latidos prematuros auriculares, reducen la fibrosis, y pueden reducir la tasa de recaídas después de la cardioversión en pacientes con FA. Estos fármacos pueden reducir la duración de la onda P, el número de los intentos necesarios de desfibrilación para restaurar el ritmo sinusal, y el número de reingresos hospitalarios en pacientes con FA. El retiro de una terapia con inhibidores de la ECA se ha asociado con FA postoperatoria en pacientes sometidos a cirugía de bypass coronario. La terapia concomitante con inhibidores de la ECA y medicamentos antiarrítmicos mejoran el

mantenimiento del ritmo sinusal^{6,7}. En cambio nuestra población no mostró diferencias en el consumo de este medicamento, por lo que no se pudo corroborar lo informado por estudios previos.

Los β -bloqueadores son más usados en los casos de pacientes que padecen de FA permanente o persistente, es decir, cuando ya se ha presentado la FA, aunque también, se pueden usar como terapia preventiva para la fibrilación auricular postoperatoria administrándolos en forma precoz luego de la cirugía, según lo descrito por guías clínicas vigentes. Un meta-análisis de 28 estudios encontró que los β -bloqueadores disminuyen la FA postoperatoria y otras arritmias supraventriculares⁷. El consumo de β -bloqueadores en nuestra población en estudio no mostró una protección por parte de este medicamento, además que solo se pesquiso su uso antes de realizarse la cirugía.

La ocurrencia de FA postoperatoria global en la población del estudio en ambos hospitales fue de 26%, valor que está dentro de lo descrito previamente en literatura^{32, 56}. La incidencia de FA postoperatoria en otros estudios fluctúa entre un 20% a un 45%^{32, 46}, por lo tanto este estudio se encuentra en el rango. Sin embargo, los pacientes del INT presentan un 19% y los de la HCUC presentan un valor más alto, de 32%. Esta diferencia podría explicarse por la diferencia en la disponibilidad en cuanto a recursos materiales de ambos centros asistenciales, así como en la disponibilidad de personal en las respectivas salas en donde se permanecieron los pacientes durante el postoperatorio. Un estudio adecuado debiera contemplar una monitorización estrecha de los pacientes durante todo el tiempo del estudio.

El estrés oxidativo es el factor promotor de FA de máximo interés en este estudio, y su valoración se hizo a nivel local por medio de la medición de la carbonilación de proteínas en el tejido cardíaco y a nivel sistémico por medio de la medición de la actividad plasmática de las enzimas antioxidantes catalasa y SOD eritrocitaria en muestras sanguíneas.

La técnica para determinar carbonilación de proteínas fue difícil de implementar debido a su complejidad y a la escasez de muestra disponible. El mejor método para realizar la cuantificación consistió en corregir los resultados arrojados por una tinción realizada con solución de Coomassie realizada en la misma membrana, la que arrojó el contenido de proteínas totales de la muestra.

La técnica utilizada en este estudio fue por kit de Oxyblot, utilizando como procedimiento western blot. Como cada membrana fue capaz de contener sólo 8 pacientes, de un total de 66, se utilizó un estándar interno para poder correlacionar cada una de las membranas. Una mejor técnica hubiese sido la utilización de HPLC, puesto que se hubiese podido realizar más determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas, lo que hubiese permitido identificar y comparar las bandas en cada paciente. Esto no fue posible ya que para algunas bandas (sobre todo cerca de los 72 kDa, Figura 6, página 42) se observa una saturación de las bandas, además que hay bandas que son difíciles de determinar por la poca precisión de la señal.

Los resultados obtenidos en nuestros pacientes no muestran diferencias entre el grado de carbonilación de proteínas cardíacas entre pacientes que fibrilan y no fibrilan con posterioridad a la cirugía, como tampoco entre las actividades plasmáticas de SOD eritrocitaria y catalasa antes o después de la cirugía. Mihm et al.³⁰ fueron los primeros en investigar la carbonilación de proteínas en tejido cardíaco en donde comparan pacientes que sufren FA permanente (7 pacientes) con pacientes en ritmo sinusal (6 pacientes), todos ellos con indicación de cirugía cardíaca durante la cual toman una muestra de tejido y encuentran que los pacientes en FA al momento de la cirugía presentan niveles mayores de carbonilación de proteínas cardíacas que los pacientes en ritmo sinusal. Otro estudio es el de Ramlawi et al.³², más parecido al nuestro, en donde determinan carbonilación de proteínas cardíacas usando el kit de Oxyblot, el mismo utilizado en nuestro estudio. Ellos estudiaron pacientes sometidos a cirugía cardíaca, comparando aquellos que se mantuvieron en ritmo sinusal (11 pacientes) con los que desarrollaron FA después de la cirugía (13 pacientes), encontrando valores de carbonilación en tejido cardíaco más elevados en los pacientes que fibrilaron. Nuestro estudio no arrojó diferencias en la carbonilación de tejido cardíaco entre ambos grupos de pacientes, aunque el valor de p arrojado por el análisis estadístico realizado ($p=0,0592$), podría indicar una tendencia en este sentido, con mayor índice de carbonilación de proteínas en pacientes que desarrollan FA postoperatoria. Creemos importante mencionar que nuestro estudio contempla un número de pacientes mayor que los 2 estudios mencionados, con 45 pacientes que se mantuvieron en ritmo sinusal y 21 que desarrollaron FA postoperatoria. No obstante lo anterior, es posible que un número de pacientes algo mayor nos hubiera permitido demostrar esta diferencia en los niveles de carbonilación.

Los marcadores de estrés oxidativo sistémico (actividad plasmática de SOD eritrocitaria y de catalasa), fueron comparados por medio de sus niveles antes y después de cirugía entre ambos grupos de pacientes, no arrojando ninguna diferencia. La SOD mostró una tendencia a una mayor variación de su actividad pre-post-quirúrgica en pacientes que desarrollaron FA, con un valor de p cercano a 0,05 ($p=0,0585$). Un número más elevado de pacientes podría haber evidenciado esta potencial diferencia. Dudley et. al. ²⁵ demostró niveles de SOD elevados en fibrilación auricular en un modelo animal, de los cuales usó tejido cardíaco. En este estudio en cambio son pacientes a los cuales se les extrajo una muestra sanguínea. En cuanto a la catalasa, su actividad no mostró diferencias entre ambos grupos ni con respecto a sus valores preoperatorios, ni a los postoperatorios, ni a las variaciones pre-postoperatorias.

Los resultados obtenidos muestran una coincidencia en la tendencia a un mayor nivel de carbonilación de proteínas cardíacas y una mayor variación en la actividad pre-postoperatoria de SOD eritrocitaria en pacientes que presentaron fibrilación auricular postoperatoria. Esto no se puede verificar estadísticamente debido a que ninguno de los dos parámetros arrojó diferencias significativas entre ambos grupos, pero podría sugerir una posible correlación entre ambos parámetros que pudiera hacerse evidente con un estudio más amplio. Además, debido a que los radicales libres son agentes oxidantes muy fuertes al poseer un electrón desapareado y vidas medias muy cortas (por ejemplo, el radical hidroxilo posee una vida media de 10^{-9} segundos ²⁰), sería recomendable que la medición de las enzimas antioxidantes se vaya monitoreando de una manera más eficaz, con rigurosidad en los intervalos de tiempo y una toma de muestras más temprana para medir estrés oxidativo plasmático (por ejemplo, a las 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h), para obtener una cinética del comportamiento de la enzima y compararla entre pacientes que experimentan FA postoperatoria con los que no la experimentan. Por ejemplo, Ramlawi et al. ³², toman muestras sanguíneas a las 6 h y al día 4 del postoperatorio, y observan el comportamiento de los peróxidos, obteniendo a las 6 h una clara diferencia, estadísticamente significativa, entre los pacientes que experimentan FA postoperatoria con respecto a los que no la experimentan, pero en cambio al día 4 no detectan ninguna diferencia.

Además, habría sido recomendable evaluar no sólo el comportamiento de las enzimas antioxidantes eritrocitarias a nivel sistémico, sino que también a nivel local, lo que no se pudo realizar por la poca cantidad de muestra.

Existen otros estudios que describen una relación de los niveles de estrés oxidativo y el daño cardiaco. Un estudio es el de Vukasovic et al ⁵⁷ que toma muestras de plasma y fluido pericardial del ventrículo izquierdo y relaciona estos valores con los niveles de MDA, encontrando una correlación en el sentido de que a mayor daño del ventrículo mayores son los niveles del MDA. Otro estudio es de Carnes et al ⁵⁶ en donde demuestra que el consumo de la vitamina C (antioxidante) inhibe la formación de nitrotirosinas en el corazón. Esto nos induce a sugerir que el estrés oxidativo sistémico podría estar relacionado con el daño al tejido cardiaco, y que éste se puede expresar de diferentes formas, como por ejemplo la fibrilación auricular, entre otras.

Este estudio tiene varias limitaciones. La principal tiene relación con un posible subregistro de los casos de FA en el postoperatorio, debido a que los pacientes pasan alrededor de 2 días en la unidad de cuidados intensivos (UCI), en donde son monitoreados, para después ser trasladados a la unidad coronaria (1 a 2 días) y finalmente enviados a la sala, donde la monitorización es menos rigurosa. La pesquisa de la FA se realizó mediante la ficha clínica, por lo que, debido a que hay solo 2 días en donde la vigilancia de los pacientes intensiva (en UCI), puesto que en la unidad coronaria (días 3 a 4) la enfermera tiene a cargo más pacientes y el médico no siempre está presente, se corre el riesgo de que el paciente experimente un evento transitorio sin detección, riesgo que es más marcado cuando, al día 3 o posterior, el paciente pasa a sala, en donde las probabilidades de un registro de POAF en la ficha clínica disminuye dado que, además, hay episodios de FA que son imperceptibles para el paciente.

7. Conclusiones

- La aparición de fibrilación auricular postoperatoria se manifestó en el 26% de los pacientes estudiados.
- Hay un mayor porcentaje de hombres que se someten a cirugía de revascularización miocárdica
- La edad se confirma como el factor predictivo más sólido de fibrilación auricular post operatoria. Los pacientes de mayor edad tienen un mayor riesgo de sufrir fibrilación auricular postoperatoria.
- Hay una alta prevalencia de consumo de medicamentos de uso cardiovascular en la población del estudio, pero éstos no tienen ninguna incidencia en la aparición de FA.
- La mayoría de los pacientes presenta hipertensión (77%) y otras patologías, como diabetes mellitus y dislipidemia, pero estos factores de riesgo cardiovascular no tienen ninguna incidencia en la presencia de FA en el post-operatorio.
- No hay una diferencia estadísticamente significativa entre la actividad de los sistemas antioxidantes enzimáticos estudiados y la ocurrencia de FA postoperatoria. No obstante lo anterior, la SOD eritrocitaria muestra un valor cercano a la significancia en la variación perioperatoria de su actividad, siendo mayor en los pacientes que experimentaron fibrilación auricular.
- No hay una diferencia estadísticamente significativa en la carbonilación de proteínas cardíacas entre los pacientes que experimentan fibrilación auricular postoperatoria y los que no la experimentan. Sin embargo, se observa una tendencia en los pacientes que fibrilan a presentar un mayor nivel de carbonilación (13,05%) con respecto a los que no fibrilan.

8. Bibliografía

- 1 Gaziano TA, Opie LH, Weinstein MC. Cardiovascular disease prevention with a multidrug regimen in the developing world: a cost-effectiveness analysis. *Lancet*. 2006; **368**: 679-86.
- 2 Medina E, Kaempffer A. Enfermedades Cardiovasculares en Chile. Aspectos epidemiológicos. *Rev Chilena de Cardiología*. 2007; **26**: 219-25.
- 3 Ministerio de Salud. I Encuesta Nacional de Salud de Chile. 2003.
- 4 Marrugat J. Estimación del riesgo coronario en España mediante la ecuación de Framingham calibrada *Rev Esp Cardiología*. 2003; **56**: 253-61.
- 5 Lee R, Kruse J, McCarthy PM. Surgery for atrial fibrillation. *Nat Rev Cardiol*. 2009; **6**: 505-13.
- 6 Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation--executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation). *J Am Coll Cardiol*. 2006; **48**: 854-906.
- 7 National Collaborating Centre for Chronic Conditions. Atrial fibrillation: national clinical guideline for management in primary and secondary care. London: Royal College of Physicians 2006, 3-100.
- 8 Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*. 2002; **415**: 219-26.
- 9 Flórez J. Farmacología Humana. Ed. 5th, Barcelona, Elsevier, 2008, capítulo 38: 749-770.
- 10 Nattel S. Atrial electrophysiology and mechanisms of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2003; **8 Suppl 1**: S5-11.
- 11 Nattel S, Opie LH. Controversies in atrial fibrillation. *Lancet*. 2006; **367**: 262-72.
- 12 Sanchez-Quinones J, Marin F, Roldan V, Lip GY. The impact of statin use on atrial fibrillation. *QJM*. 2008; **101**: 845-61.
- 13 Halliwell B, Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine. Ed. 4th, New York, Oxford University Press, 2007, 187-267.
- 14 Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci*. 2009; **84**: 705-12.

- 15 Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003; **329**: 23-38.
- 16 Stadtman ER. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med*. 2002; **33**: 597-604.
- 17 Maack C, Kartes T, Kilter H, Schafers HJ, Nickenig G, Bohm M, *et al*. Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation*. 2003; **108**: 1567-74.
- 18 Blum A. Heart failure--new insights. *Isr Med Assoc J*. 2009; **11**: 105-11.
- 19 Heistad DD, Wakisaka Y, Miller J, Chu Y, Pena-Silva R. Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009; **73**: 201-7.
- 20 Cascales M. Estrés oxidativo. Envejecimiento y enfermedad. Madrid, Instituto de España, 1999, 9-125.
- 21 Ceconi C, Boraso A, Cargnoni A, Ferrari R. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Arch Biochem Biophys*. 2003; **420**: 217-21.
- 22 Fearon IM, Faux SP. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol*. 2009; **47**: 372-81.
- 23 Day BJ. Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochem Pharmacol*. 2009; **77**: 285-96.
- 24 Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2000; **18**: 655-73.
- 25 Dudley SC, Jr., Hoch NE, McCann LA, Honeycutt C, Diamandopoulos L, Fukai T, *et al*. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation*. 2005; **112**: 1266-73.
- 26 Ren J, Li Q, Wu S, Li SY, Babcock SA. Cardiac overexpression of antioxidant catalase attenuates aging-induced cardiomyocyte relaxation dysfunction. *Mech Ageing Dev*. 2007; **128**: 276-85.
- 27 Huang CX, Liu Y, Xia WF, Tang YH, Huang H. Oxidative stress: a possible pathogenesis of atrial fibrillation. *Med Hypotheses*. 2009; **72**: 466-7.
- 28 Tousoulis D, Zisimos K, Antoniades C, Stefanadi E, Siasos G, Tsioufis C, *et al*. Oxidative stress and inflammatory process in patients with atrial fibrillation: the role of left atrium distension. *Int J Cardiol*. 2009; **136**: 258-62.

- 29 Korantzopoulos P, Kolettis TM, Galaris D, Goudevenos JA. The role of oxidative stress in the pathogenesis and perpetuation of atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2007; **115**: 135-43.
- 30 Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR, *et al.* Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation.* 2001; **104**: 174-80.
- 31 Kim YM, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B. Association of atrial nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity with the development of atrial fibrillation after cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol.* 2008; **51**: 68-74.
- 32 Ramlawi B, Otu H, Mieno S, Boodhwani M, Sodha NR, Clements RT, *et al.* Oxidative stress and atrial fibrillation after cardiac surgery: a case-control study. *Ann Thorac Surg.* 2007; **84**: 1166-72; discussion 72-3.
- 33 Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta.* 2005; **1703**: 93-109.
- 34 Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003; **9**: 169-76.
- 35 Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994; **233**: 346-57.
- 36 Nystrom T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* 2005; **24**: 1311-7.
- 37 Ferro CR, Oliveira DC, Nunes FP, Piegas LS. Postoperative atrial fibrillation after cardiac surgery. *Arq Bras Cardiol.* 2009; **93**: 59-63.
- 38 Ji Q, Mei Y, Wang X, Sun Y, Feng J, Cai J, *et al.* Effect of preoperative atorvastatin therapy on atrial fibrillation following off-pump coronary artery bypass grafting. *Circ J.* 2009.
- 39 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; **193**: 265-75.
- 40 Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Gagliano N, Lusini L, Milzani A, *et al.* Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant signs of severe functional impairment. *Free Radic Biol Med.* 2001; **31**: 1075-83.
- 41 Smerjanc SM, Bizzozero OA. Cytoskeletal protein carbonylation and degradation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem.* 2008; **105**: 763-72.

- 42 McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem.* 1969; **244**: 6056-63.
- 43 Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; **247**: 3170-5.
- 44 Beers RF, Jr., Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952; **195**: 133-40.
- 45 Ommen SR, Odell JA, Stanton MS. Atrial arrhythmias after cardiothoracic surgery. *N Engl J Med.* 1997; **336**: 1429-34.
- 46 Arribas-Leal J. Epidemiología y nuevos predictores de la fibrilación auricular tras cirugía coronaria. *Rev Esp Cardiol.* 2007; **60**: 841-7.
- 47 Rich MW. Epidemiology of atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol.* 2009; **25**: 3-8.
- 48 Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV, *et al.* Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA.* 2001; **285**: 2370-5.
- 49 Volgman AS, Manankil MF, Mookherjee D, Trohman RG. Women with atrial fibrillation: Greater risk, less attention. *Gen Med.* 2009; **6**: 419-32.
- 50 Dublin S, French B, Glazer NL, Wiggins KL, Lumley T, Psaty BM, *et al.* Risk of new-onset atrial fibrillation in relation to body mass index. *Arch Intern Med.* 2006; **166**: 2322-8.
- 51 Wanahita N, Messerli FH, Bangalore S, Gami AS, Somers VK, Steinberg JS. Atrial fibrillation and obesity--results of a meta-analysis. *Am Heart J.* 2008; **155**: 310-5.
- 52 Marin F, Pascual DA, Roldan V, Arribas JM, Ahumada M, Tornel PL, *et al.* Statins and postoperative risk of atrial fibrillation following coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol.* 2006; **97**: 55-60.
- 53 Liakopoulos OJ, Choi YH, Haldenwang PL, Strauch J, Wittwer T, Dorge H, *et al.* Impact of preoperative statin therapy on adverse postoperative outcomes in patients undergoing cardiac surgery: a meta-analysis of over 30,000 patients. *Eur Heart J.* 2008; **29**: 1548-59.

- 54 Novo G, Guttilla D, Fazio G, Cooper D, Novo S. The role of the renin-angiotensin system in atrial fibrillation and the therapeutic effects of ACE-Is and ARBS. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; **66**: 345-51.
- 55 L'Allier PL, Ducharme A, Keller PF, Yu H, Guertin MC, Tardif JC. Angiotensin-converting enzyme inhibition in hypertensive patients is associated with a reduction in the occurrence of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2004; **44**: 159-64.
- 56 Carnes CA, Chung MK, Nakayama T, Nakayama H, Baliga RS, Piao S, *et al.* Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ Res.* 2001; **89**: E32-8.
- 57 Vukasovic JL, Moraga F, Diaz-Araya G, Turner E, Chiong M, Uriarte P, *et al.* Oxidative stress in pericardial fluid and plasma and its association with ventricular function. *Int J Cardiol.* 2005; **101**: 197-201.