



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INFLAMACIÓN EN LA
GENERACIÓN DE FIBRILACIÓN AURICULAR POSTOPERATORIA EN
PACIENTES SOMETIDOS A CIRUGÍA CARDÍACA CON CIRCULACIÓN
EXTRACORPÓREA”

ALEJANDRO SEPÚLVEDA ARAYA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas

PROFESOR GUÍA: Prof. Dr. RAMÓN RODRIGO SALINAS

SANTIAGO – CHILE
2011



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INFLAMACIÓN EN LA
GENERACIÓN DE FIBRILACIÓN AURICULAR POSTOPERATORIA EN
PACIENTES SOMETIDOS A CIRUGÍA CARDÍACA CON CIRCULACIÓN
EXTRACORPÓREA”

ALEJANDRO SEPÚLVEDA ARAYA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : RAMÓN RODRIGO SALINAS
PROFESOR CONSEJERO : HÉCTOR ADARMES AHUMADA
PROFESOR CONSEJERO : VÍCTOR PARRAGUEZ GAMBOA

SANTIAGO – CHILE
2011

RESUMEN	iv
SUMMARY.....	v
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	2
3. HIPÓTESIS	8
4. OBJETIVO GENERAL.....	8
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
5.1 Los niveles de lipoperoxidación pre y post operatorios.....	8
5.2 Los niveles de variables inflamatorias pre y post operatorias.	8
5.3 Los niveles de potencial antioxidante extracelular pre y post operatorios.	8
5.4 La presentación de FAPO.	8
5.5 La relación de los cambios inflamatorios, de potencial antioxidante y de estrés oxidativo con la presentación de FAPO.	8
6. MATERIALES Y MÉTODOS	9
6.1 Diseño del estudio.....	9
6.2 Procesamiento de la muestra.....	10
6.3 Variables inflamatorias.....	11
6.3.1 Proteína C reactiva ultrasensible.....	11
6.3.2 Recuento de leucocitos.	11
6.4 Variables de estrés oxidativo	12
6.4.1 Plasmáticas.....	12
6.4.1.1 Capacidad antioxidante del plasma (FRAP).....	12
6.4.1.2 Malondialdehído en plasma.	12
6.4.1.3 F ₂ -isoprostanos.....	13
6.4.2 Eritrocitos.....	14

6.4.2.1 Malondialdehído en eritrocitos.	14
6.4.2.2 Determinación de hemoglobina en el glóbulo rojo.	15
6.4.2.3 Relación glutatión reducido/glutatión oxidado.	15
6.4.2.4 Catalasa.	17
6.4.2.5 Superóxido dismutasa.	18
6.4.2.6 Glutatión peroxidasa.	19
6.5 Pesquisa de fibrilación auricular postoperatoria.	21
6.6 Métodos estadísticos.	22
6.6.1 Determinación de valores normales de status antioxidante y biomarcadores de estrés oxidativo.	22
6.6.2 Cálculo del tamaño muestral.	22
6.6.3 Análisis estadístico.	22
7. RESULTADOS	23
7.1 Características de los pacientes.	23
7.2 Variables inflamatorias.	26
7.2.1 Proteína C reactiva ultrasensible.	26
7.2.2 Recuento de leucocitos.	27
7.3 Variables de estrés oxidativo.	28
7.3.1 Plasmáticas.	28
7.3.1.1 Capacidad antioxidante del plasma.	28
7.3.1.2 Malondialdehído en plasma.	29
7.3.1.3 F ₂ -isoprostanos.	30
7.3.2 Eritrocitos.	30
7.3.2.1 Malondialdehído en eritrocitos.	30
7.3.2.2 Relación glutatión reducido/glutatión oxidado.	32

7.3.2.3 Catalasa.....	33
7.3.2.4 Superóxido dismutasa.	34
7.3.2.5 Glutación peroxidasa.	35
8. DISCUSIÓN	36
9. CONCLUSIONES	38
10. REFERENCIAS.....	39

RESUMEN

En la patogenia de la fibrilación auricular postoperatoria (FAPO) participan el estrés oxidativo y la inflamación generados durante la cirugía cardíaca con circulación extracorpórea (CCE). El evento de isquemia/reperfusión al que se somete el tejido cardíaco durante la cirugía da lugar a la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) que generan daños en biomoléculas que terminan por remodelar eléctrica y estructuralmente el músculo cardíaco.

El objetivo de esta memoria de título fue medir variables de estrés oxidativo e inflamación y determinar, en el período posterior a la cirugía, si estas variables se relacionan con el riesgo de presentación de FAPO.

Se realizó un ensayo clínico controlado, aleatorio, doble ciego con pacientes que iban a ser sometidos a cirugía cardíaca y cumplieran con determinados criterios de inclusión al protocolo. La edad promedio de los pacientes seleccionados fue de 59 años. Al momento de la cirugía y 6-8 hrs posterior a ésta se tomaron muestras de sangre. Luego de la cirugía se pesquisó la ocurrencia de fibrilación auricular hasta el alta.

Para evaluar los parámetros inflamatorios se midió la proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us) y se realizó un recuento de leucocitos. Para determinar los parámetros de estrés oxidativo se determinó en plasma sanguíneo su capacidad antioxidante (FRAP), la concentración de malondialdehído (MDA) y de F₂-isoprostanos. En eritrocitos se determinó el MDA, la relación glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) y la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa.

Se pudo confirmar que la CCE genera estrés oxidativo e inflamación en el periodo postoperatorio. Los pacientes suplementados presentaron menos FAPO y mayores niveles de potencial antioxidante, menores niveles de lipoperoxidación y de inflamación. Con los resultados obtenidos se podría sugerir que ambos factores relacionados con la patogenia de la FAPO podrían ser atenuados mediante el reforzamiento del sistema de defensas antioxidantes y así reducir la vulnerabilidad del tejido miocárdico a la ocurrencia de la arritmia.

SUMMARY

During the cardiac surgery with extracorporeal circulation (ECC) the occurrence of postoperative atrial fibrillation (POAF) may be influenced by the processes of inflammation and oxidative stress. The event of ischaemia-reperfusion to which the cardiac tissue is subjected gives rise to overproduction of reactive oxygen species (ROS) reactive nitrogen species (RNE). These species cause damage to biomolecules and the repair mechanism lead to cardiac tissue remodeling.

The aim of this study was to determine the variables related with oxidative stress and inflammation in the blood of patients subjected to ECC and their relationship with the risk of POAF occurrence.

A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial was performed with patients who were going to be subjected to cardiac surgery and fulfilled the previously established inclusion and exclusion criteria. The mean age of the selected candidates was of 59 years. Two blood samples were withdrawn before and 6-8 h after surgery. Detection of the occurrence of atrial fibrillation was detected ever since surgery until withdrawn.

Serum levels of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and leukocyte count were used to evaluate the inflammatory parameters. In turn, oxidative stress related parameters were assessed through plasma total capacity for ferric ion reduction (FRAP), malondialdehyde (MDA) and F₂-isoprostane levels; together with erythrocyte MDA, reduced to oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratio and the activity of the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase.

It could be confirmed that the ECC causes oxidative stress and inflammation, respect of the preoperative state. Both processes can be related with the underlying mechanism responsible for POAF. Accordingly, the supplemented patients exhibit lower levels of lipid peroxidation and inflammatory parameters, but higher antioxidant status, thus contributing to support a role of oxidative stress and inflammation in the pathophysiology of this arrhythmia.

1. INTRODUCCION

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia más frecuente en la población adulta. Actualmente existe considerable evidencia acerca de la participación del estrés oxidativo y la inflamación en su mecanismo patogénico. Una de las condiciones clínicas que genera FA es la cirugía cardíaca, ya que alrededor del 30% de los pacientes sometidos a ella desarrolla FA durante los primeros días que siguen a la cirugía, configurándose así la FA postoperatoria (FAPO). El arsenal de fármacos anti-arrítmicos actualmente disponible sólo ofrece beneficios sub-óptimos y no están exentos de efectos colaterales severos como la fibrosis pulmonar, entre otros. Durante la cirugía cardíaca con circulación extracorpórea se produce un característico estado de respuesta inflamatoria sistémica. Además, resulta inevitable someter al corazón a una disminución temporal de la perfusión, originándose un evento de isquemia/reperfusión, que es una reconocida causa de producción de radicales libres, responsables del estrés oxidativo que sufre la masa miocárdica. Los efectos de este trastorno pueden incluir la FAPO, dependiendo de la duración e intensidad de la isquemia y de los factores condicionantes previos, tales como la edad, fibrosis preexistente y la magnitud de las defensas antioxidantes disponibles. Tanto las enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) como las sustancias antioxidantes endógenas y exógenas (glutatión, ascorbato, α -tocoferol, polifenoles) dan cuenta de la resistencia del miocardio contra el estrés oxidativo. Estas defensas antioxidantes se pueden reforzar por medio de la suplementación con ácidos grasos poli-insaturados omega 3 (PUFA n-3) y de vitaminas C y E, lo que aumentará las defensas enzimáticas y no enzimáticas respectivamente.

La producción de estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria que se asocian a la cirugía cardíaca con circulación extracorpórea actuarían como estímulos desencadenantes de FA. Por lo tanto, el cambio de los biomarcadores de estos procesos puede ser un indicador de riesgo de FAPO.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia cardíaca de mayor incidencia en la población adulta, bordeando el 1% en población general y un 5% en los mayores de 65 años (Kim *et al.*, 2003; Hersi y Wyse, 2005), y que contribuye en gran medida a la morbilidad y mortalidad por trastornos cardiovasculares, primera causa de muerte en nuestro país y en el mundo. Existen 2 formas clínicas de presentación de la FA, la paroxística y la permanente. La FA tiende a perpetuarse cuando existe un sustrato anatómico y funcional alterado de las aurículas. Una de las variedades frecuentes de presentación de la FA paroxística es la que ocurre en el postoperatorio de cirugía coronaria, observada en un 20-30% de los casos. Esta FA es habitualmente precoz, dentro de las primeras 24 a 48 h y su duración puede ser de horas a días (Korantzopoulos *et al.*, 2003). Se han realizado intentos por prevenir este trastorno mediante fármacos y uso de marcapasos durante el período perioperatorio, pero los resultados no han sido satisfactorios (Daubert y Mabo, 2000). Entre los factores precipitantes de este tipo de arritmia, se ha considerado la participación del proceso inflamatorio y del estrés oxidativo propios de la cirugía. La isquemia/reperfusión tisular a la que inevitablemente se somete el tejido cardíaco durante la circulación extracorpórea, provocará un aumento de la concentración de especies reactivas del oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), los cuales se constituirán en mensajeros intracelulares capaces de inducir la expresión de genes proinflamatorios (Cave *et al.*, 2005).

El estrés oxidativo, a causa del aumento de los radicales libres, provocará reacciones de lipoperoxidación y nitración de residuos de tirosina, con el consiguiente cambio estructural de las proteínas del músculo cardíaco. Posteriormente aparecerán procesos reparativos que podrían ser responsables de la generación de fibrosis, con los efectos morfológicos y particularmente funcionales que esto implica para la propagación del impulso eléctrico y el efecto mecánico asociado (remodelado). Este remodelado estructural depende en parte del remodelado eléctrico y se caracteriza por dilatación auricular, fibrosis, procesos apoptóticos y de desdiferenciación celular, entre otros (Veenhuyzen *et al.*, 2004). Los estudios histológicos muestran desdiferenciación del cardiomiocito a una forma fetal,

disminuyendo su capacidad contráctil y aumentando la resistencia a la muerte inducida por calcio (Thijssen *et al.*, 2001; Roden, 2004). Los cardiomiocitos auriculares observados bajo microscopía electrónica muestran cambios en mitocondrias, acumulación de glicógeno, pérdida de miofibrillas, redistribución de la cromatina nuclear y reducción del retículo sarcoplásmico (Levy y Sbragia, 2005). Otro aspecto del remodelado estructural es la activación de los fibroblastos con aumento de la fibrosis y la consecuente heterogeneidad eléctrica del tejido conductor (Bosch *et al.*, 2003; Antzelevitch y Markides, 2005).

En general, el remodelado eléctrico se revierte rápidamente luego de reinstaurado el ritmo sinusal, aún en cuadros de FA prolongada (Thijssen *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha postulado que esta recuperación es más lenta, siendo en parte responsable de la recaída de la arritmia post-cardioversión eléctrica (Van Wagoner, 2003). Después de cortos períodos de FA, tanto el período refractario como la actividad contráctil se recuperan en dos a tres días luego de restablecido el ritmo sinusal. En casos de FA prolongada (semanas a meses), el período refractario se normaliza en unos pocos días. Sin embargo, la recuperación de la actividad contráctil puede tomar meses (Van Wagoner, 2003).

Una de las formas de bloquear esta secuencia fisiopatológica en sus primeras etapas es reforzando el sistema de defensas antioxidantes, con el fin de optimizar la depuración de las ERO que se asume están aumentadas durante esta situación (De Vecchi *et al.*, 1998). Basándose en estos antecedentes, se han realizado intentos para prevenir la FA tanto en humanos como en animales de experimentación, recurriendo al uso de corticoides, ácido ascórbico, beta-bloqueadores y ácidos grasos omega-3, entre otros (Van Wagoner, 2008; Rodrigo *et al.*, 2010).

Participación del estrés oxidativo en el mecanismo de producción de la fibrilación auricular postoperatoria

El procedimiento técnico aplicado en las cirugías cardíacas implica una agresión de este órgano, fundamentalmente derivada de los cambios de perfusión y, por ende, de oxigenación, dando lugar por esta vía a la formación de ERO. Aunque recientemente se ha señalado que pueden intervenir múltiples factores en el desarrollo de FAPO (Scherr *et al.*, 2006), las ERO y ERN pueden desempeñar un importante papel en este proceso

fisiopatológico. En primer lugar, las biomoléculas tisulares como proteínas, lípidos y DNA quedarán expuestas a recibir el impacto de las ERO, dando lugar así a un cambio bioquímico y estructural del tejido. Además, las ERO actúan en forma de mediadores o mensajeros, gatillando señales intracelulares. Así, se puede activar factores transcripcionales sensibles al estado redox celular, tales como factor nuclear Kappa B (NF- κ B), lo cual a su vez activa la expresión de genes proinflamatorios (Cave *et al.*, 2005).

Una vez iniciado el proceso inflamatorio se produce la transmigración y activación de los leucocitos, lo que contribuye a potenciar el estrés oxidativo a nivel local, junto con la liberación de mediadores como citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión, todo lo cual va a exacerbar el daño tisular, pudiendo incluso generarse zonas de necrosis de la fibra miocárdica. El paso siguiente, la reparación, involucra el riesgo del depósito de colágeno en la matriz extracelular, proceso de fibrosis intersticial que podría afectar las propiedades funcionales, tanto eléctricas como mecánicas del miocardio. Así, estudios *in vitro* han demostrado que la función contráctil de los cardiomiocitos puede ser afectada por las ERO al alterarse el ciclo del calcio, la respuesta de los miofilamentos al calcio y el metabolismo celular (Cave *et al.*, 2005).

El estrés oxidativo se presenta debido a un desbalance entre la producción de ERO, incluyendo radicales libres como el superóxido y no radicales como el peróxido de hidrógeno y mecanismos antioxidantes endógenos de defensa (Grieve y Shah, 2003; Shiomi *et al.*, 2004).

Las defensas celulares contra los agentes oxidantes son enzimas antioxidantes tales como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-Px), que constituyen la primera línea de defensa contra las ERO, ya que inactivan a estas especies químicas. La actividad de estas enzimas así como la concentración de las moléculas antioxidantes (tales como glutatión, vitamina C y vitamina E) en el miocardio condicionan la susceptibilidad de este tejido frente al efecto deletéreo de las ERO (Kim *et al.*, 2003). Los pacientes que han sido sometidos a una cirugía cardíaca, no solamente tienen una elevación de los productos de lipoperoxidación en el plasma, sino que además presentan disminución de los niveles de glutatión cardíaco, reflejo del aumento de ERO, cambios que

persisten al menos durante las primeras 24 horas del período postoperatorio (De Vecchi *et al.*, 1998).

En clínica, el estrés oxidativo se mide comúnmente a través de concentraciones plasmáticas de productos de la actividad oxidativa, malondialdehído (MDA) o F₂-isoprostanos (Shiomi *et al.*, 2004) y también a través de la actividad de enzimas antioxidantes (Reznick y Packer, 1994). El papel del estrés oxidativo en la FA aún no se ha precisado con toda claridad. Algunos investigadores han planteado que el estrés oxidativo asociado a la respuesta inflamatoria actuaría como un estímulo desencadenante de FA (Goette y Lendeckel, 2004).

A partir del estudio de miofibrillas obtenidas de orejuelas de tejido auricular derecho en pacientes con FA crónica, comparándolos con pacientes en ritmo sinusal, se demostró que hay un daño oxidativo sustancial en el miocardio auricular de los pacientes con FA crónica. Este daño parece estar mediado por la acción de los aniones hidroxilo y peroxinitrito, que conducen a la formación de carbonilos y nitrotirosinas, respectivamente, pudiendo estas últimas estar inversamente relacionadas a la actividad de creatina kinasa miofibrilar (Kim *et al.*, 2003; Korantzopoulos *et al.*, 2003; Mihm *et al.*, 2001). Además, se encontró que varias proteínas estructurales y funcionales experimentaron cambios oxidativos, sugiriendo que estas modificaciones tienen considerable impacto en las propiedades electrofisiológicas, energéticas y mecánicas de los cardiomiocitos auriculares, contribuyendo al remodelado auricular (Kim *et al.*, 2003; Korantzopoulos *et al.*, 2003; Mihm *et al.*, 2001). Varias proteínas celulares, incluyendo algunos canales de calcio y algunos receptores, son sensibles al estrés oxidativo y constituyen blancos potenciales para desencadenar la FA (Goette y Lendeckel, 2004).

Estudios en perros a los que se aceleró el ritmo auricular, mostraron que los niveles de vitamina C tisulares disminuían al mismo tiempo que aumentaba la nitración de proteínas, indicando presencia de un nivel elevado de estrés oxidativo. Este proceso, también denominado estrés nitrosativo, se acompañó de acortamiento del período refractario efectivo, el cual se atenuó aplicando un pre-tratamiento oral con vitamina C. También la acumulación de calcio producida por la taquicardia conduciría a un aumento del

estrés oxidativo y depleción de glutatión, resultando en disminución de la contractilidad cardíaca, posiblemente debido a una disminución en la corriente de calcio (Carnes *et al.*, 2001).

Un estudio de FA experimental en cerdos mostró que la producción basal del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) fue 2,7 y tres veces mayor en aurícula izquierda y orejuela auricular izquierda, respectivamente, en animales con FA que en los controles. Sin embargo, en la aurícula y orejuela derecha no se observaron tales diferencias. Estos investigadores concluyeron que el sistema NAD(P)H oxidasa tendría un papel prominente en la génesis de ERO durante FA, pues un inhibidor de esta enzima disminuyó en 91% la producción de ($O_2^{\cdot-}$) (Dudley *et al.*, 2005).

Proceso inflamatorio

La inflamación tiene un papel importante no sólo en el mecanismo patogénico de la FAPO, sino que también en su mantención (Aviles *et al.*, 2003), participando en la remodelación estructural del tejido cardiovascular, lo cual influye directamente sobre el sistema excito-conductor del músculo cardíaco (canales iónicos) (Schoonderwoerd *et al.*, 2005). Estudios experimentales en perros han demostrado que fármacos que disminuyen la respuesta inflamatoria, reducen los eventos arrítmicos (Shiroshita-Takeshita *et al.*, 2005). Los siguientes indicadores contribuyen a sustentar la participación de la inflamación en la fisiopatología de la FAPO:

- a) **Proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us).** Es una proteína de fase aguda presente en gran parte de los procesos inflamatorios. Pacientes con niveles elevados de PCR-us poseen un importante riesgo de desarrollar patologías cardiovasculares. Más aún, se ha observado elevaciones significativas de PCR-us durante los episodios paroxísticos de FA y se ha propuesto como un marcador predictivo para la recurrencia de FA (Hatzinikolaou-Kotsakou *et al.*, 2006). Sin embargo, la correlación de PCR-us con la incidencia de FA postoperatoria aún no ha sido documentada.
- b) **Recuento de leucocitos.** Diversos procesos inflamatorios, incluyendo el que se produce como un evento posterior a la cirugía cardíaca, conllevan elevación del

recuento de leucocitos, describiéndose que si este es de gran cuantía, podría predecir la aparición de FA postoperatoria (Lamm *et al.*, 2006).

En los últimos años se ha observado que pacientes con arritmias crónicas poseen un daño oxidativo miocárdico importante (Mihm *et al.*, 2001). Este daño se produciría a través del ataque de las ERO y ERN a distintas estructuras celulares (canales, proteínas, enzimas), lo que contribuiría a alterar las propiedades eléctricas del tejido cardíaco. Las ERO pueden activar factores de transcripción como el NF- κ B, Ap-1, Ap-2 y p21ras, los cuales juegan un papel crucial en la proliferación, diferenciación y morfogénesis celular (Pavlovic *et al.*, 2002). El factor de transcripción nuclear NF- κ B tendría un papel crucial en la regulación de la respuesta inflamatoria y si bien se ha demostrado que su bloqueo disminuye la remodelación ventricular y la falla cardíaca post infarto, su papel en la FA no ha sido dilucidado (Kawano *et al.*, 2006). Sin embargo, resulta razonable suponer su participación, debido a que se conoce la importancia de su efecto en la activación de genes proinflamatorios. Como consecuencia, se produciría aumento de citoquinas como la IL-6, proteínas de fase aguda (PCR) y elementos procoagulantes (fibrinógeno), además de elevar el reclutamiento de leucocitos, lo cual llevaría a exacerbar el estado inflamatorio sistémico, hecho que permitiría la génesis y mantención de la FA.

La relación del proceso inflamatorio con el estrés oxidativo radica en que ambos podrían contribuir a la generación y mantención de la FA postoperatoria, actuando el primero en la génesis (Tselentakis *et al.*, 2006) y el segundo en la remodelación de esta patología, encontrándose una relación entre ambos eventos (Korantzopoulos *et al.*, 2003). La cirugía cardíaca puede inducir un estado inflamatorio sistémico (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), cuyos mecanismos celulares de generación incluyen la participación de ERO y la mediación de factores de transcripción nuclear como el NF- κ B, el cual es clave en la regulación de la respuesta inflamatoria (Kawano *et al.*, 2006), inmune, proliferativa y apoptótica de la célula (Baeuerle y Henkel, 1994; Yamamoto y Gaynor, 2001).

3. HIPÓTESIS

La cirugía cardíaca con circulación extracorpórea inducirá estrés oxidativo e inflamación que se relaciona con la aparición de FAPO. Así, en pacientes sometidos a esta cirugía se encontrarán aumentados los parámetros de estrés oxidativo e inflamación y disminuido su potencial antioxidante en el período post operatorio temprano (seis a ocho horas posteriores a la cirugía), respecto de los que no presentan esta arritmia.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de la inflamación y el estrés oxidativo en el desarrollo de FAPO.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En pacientes sometidos a cirugía cardíaca con circulación extracorpórea determinar:

- 5.1 Los niveles de lipoperoxidación pre y post operatorios.
- 5.2 Los niveles de variables inflamatorias pre y post operatorias.
- 5.3 Los niveles de potencial antioxidante extracelular pre y post operatorios.
- 5.4 La presentación de FAPO.
- 5.5 La relación de los cambios inflamatorios, de potencial antioxidante y de estrés oxidativo con la presentación de FAPO.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio.

Se realizó un ensayo clínico controlado, aleatorio, doble ciego. Los pacientes que fueron sometidos a cirugía cardíaca, informados del estudio y que firmaron el consentimiento fueron distribuidos al azar, previa realización de electrocardiograma de reposo, a grupo placebo o grupo suplementado con una dosis diaria de 850 mg de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) en la razón de 1:2, respectivamente, desde siete días previos a la cirugía programada. Dos días antes de la cirugía se adicionó la suplementación de 500 mg de vitamina C cada 12 horas y 400 UI de vitamina E cada 24 horas. Estos tres suplementos/placebos se administraron en forma ininterrumpida hasta el alta. Los pacientes se agruparon finalmente de acuerdo a la ocurrencia o no de FA (grupo FAPO + y FAPO - respectivamente) (Fig. 1).

Los criterios de inclusión para ingresar al protocolo a los pacientes son:

1. Mayor de 18 y menor de 80 años.
2. Cirugía cardíaca de cardiopatía no congénita.
3. Ritmo sinusal al momento de la distribución al azar de los tratamientos a los pacientes.

Los criterios de exclusión del ingreso al protocolo son:

1. Fibrilación auricular crónica.
2. Reoperación cardíaca.
3. Consumo de vitamina C o vitamina E durante el mes previo a la obtención de la muestra.
4. Insuficiencia renal crónica (creatininemia > 2.0 mg/dL).
5. Insuficiencia hepática (bilirrubinemia > 3.0 mg/dL o albuminemia < 3.5 g/dL o protrombinemia < 60% en ausencia de terapia anticoagulante oral o signos ecográficos de daño hepático crónico o presencia de várices esofágicas).
6. Embarazo.

7. Cardiopatía congénita.
8. Cirugía de urgencia.



Figura 1. Diseño del protocolo

6.2 Procesamiento de la muestra.

Se obtuvieron dos muestras de sangre, una inmediatamente antes de la intervención quirúrgica y otra en el período post-operatorio temprano (6-8 hrs. posteriores a la cirugía).

La muestra de sangre fue procesada de la siguiente manera:

- Se recibió en tubos con EDTA 5% como anticoagulante.
- A continuación se centrifugó a 2862 x g durante 15 min, para separar el plasma del sedimento (eritrocitos).
- El sedimento obtenido fue lavado con suero fisiológico y centrifugado a 2862 x g durante 10 min, procedimiento que se repitió dos veces.
- El sedimento fue hemolizado con 3 volúmenes de agua destilada.

- Tanto el plasma como el hemolizado de eritrocitos fueron almacenados a -70°C.
- En el plasma se determinó la capacidad antioxidante total, la concentración de malondialdehído (MDA) y los niveles de F₂-isoprostanos, mientras que en el hemolizado de eritrocitos se determinó la relación glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG), el MDA y la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GSH-Px.

6.3 Variables inflamatorias.

6.3.1 Proteína C reactiva ultrasensible.

Se determinó en plasma sanguíneo por método de ELISA (Magiwell CRP kit United Biotech, Mountain View) (Macy *et al.*, 1997).

6.3.2 Recuento de leucocitos.

Se determinó por el método del hemocitómetro.

Procedimiento:

- Llenar la pipeta de Thoma para leucocitos (blanca) con sangre hasta la marca de 0.5 con ayuda de una boquilla.
- Secar el exceso de sangre con una gasa limpia.
- Sin dejar caer alguna gota de sangre, llenar con el líquido diluyente de Turck hasta la marca de 11 sin pasar de la marca.
- Tapar los extremos de la pipeta con papel parafilm.
- Mezclar el contenido en el agitador para pipetas de Thoma durante 1 min.
- Desechar las primeras 3 gotas y se llena el hemocitómetro.
- Contar las células con el objetivo 10X en las cuatro cuadrículas primarias con la ayuda de un contador mecánico.
- Calcular el número de leucocitos/mm³ multiplicando el valor obtenido por 50.

6.4 Variables de estrés oxidativo

6.4.1 Plasmáticas

6.4.1.1 Capacidad antioxidante del plasma (FRAP)

Se utilizó el método FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) que mide la capacidad del plasma para reducir el hierro férrico a ferroso siguiendo la cinética a 593 nm (Benzie y Strain, 1996). La técnica consiste en lo siguiente:

Reactivos utilizados:

- solución FRAP: contiene 15 mL de Tampón acetato pH 3,6 + 1,5 mL de solución TPTZ (2,4,6-tripiridil-S-triazina) y 1,5 mL de cloruro férrico. Se preincuba en baño termostático a 37°C durante 2 min.

Procedimiento:

- Se preparan los tubos blancos que contienen 750 µL de solución FRAP y 100 µL de agua bidestilada. Se incuba en baño termostático a 37°C durante 2 min.
- Los tubos de muestra contienen 750 µL de solución FRAP más 75 µL de agua bidestilada. Se incuba en baño termostático a 37°C durante 2 min.
- El tubo blanco se agita en Vortex, la mezcla se transfiere a cubeta de 1 mL y se realiza un barrido (*scan blank*) hasta estabilizar la absorbancia del blanco en un valor cercano a cero a 593 nm. La lectura del blanco corresponde al valor cero de la curva de calibración.
- Al tubo muestra se le agregan 25 µL de plasma o estándar, se agita en Vortex y se transfiere a cubeta de 1 mL. Se espera 60 seg y se registran las lecturas a 593 nm. Estas lecturas corresponden a muestras o estándares.
- Los valores obtenidos se expresan en µM (micromolar).

6.4.1.2 Malondialdehído en plasma.

Se determinó por espectrofotometría, luego de aplicar la reacción con ácido tiobarbitúrico, seguida de extracción con solventes orgánicos (Ohkawa *et al.*, 1979). La técnica realizada se describe a continuación:

Reactivos utilizados:

- Ácido metafosfórico 1,22 M.
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,44 M.
- 1,1,3,3-tetrametoxipropano (MDA) 1mM.
- Tampón fosfato 25 mM pH 6,5.
- Hidróxido de sodio (NaOH) 1 M.

Procedimiento:

- En tubo de vidrio de 3 mL, mezclar:
 - 250 μ L de ácido metafosfórico 1,22 M.
 - 450 μ L de agua HPLC.
 - 50 μ L de muestra, estándar (MDA) o agua (blanco).
 - 250 μ L de TBA 0,44 M.
- Hervir la mezcla durante 1 h. Luego enfriar a 4°C por 10 min.
- Inmediatamente antes de la inyección se mezclan 200 μ L de muestra, estándar o blanco con 360 μ L de metanol y 40 μ L de NaOH 1 M.
- Centrifugar a 4000 rpm x 5 min.
- Filtrar las muestras.
- Leer la absorbancia a 532 nm.
- Los resultados obtenidos se expresan en: μ mol MDA/L.

6.4.1.3 F₂-isoprostanos.

Se determinaron mediante inmunoensayo enzimático (EIA), usando kits (Cayman, Chemical, Ann Arbor, MI) (Collins *et al.*, 1999).

Las muestras de plasma destinadas a la medición de F₂-isoprostanos se recibieron en tubos plásticos impregnados de hidroxitolueno butilado (concentración final 1 mM) como antioxidante.

Se determinó en una muestra de 500 μ L de plasma a la que se aplicó una técnica de inmunoensayo enzimático (EIA) (Pradelles *et al.*, 1985) utilizando kits para F₂-isoprostanos. Las muestras de plasma fueron leídas a 420 nm en un lector de microplacas

modelo Sunrise (Tekan, Salzburgo, Austria). Los resultados fueron expresados como pg de F₂-isoprostanos /mL.

6.4.2 Eritrocitos.

6.4.2.1 Malondialdehído en eritrocitos.

Se determinó por espectrofotometría luego de aplicar la reacción con ácido tiobarbitúrico seguida de extracción con solventes orgánicos (Ohkawa *et al.*, 1979). La técnica realizada se describe a continuación:

Reactivos utilizados:

- Dodecil sulfato de sodio (SDS) 8,1%.
- Solución de perfusión: KCl 1,15%.
- Ácido acético 20% pH 3,5.
- TBA 0,8%.
- n-butanol-piridina.

Procedimiento:

- Dilución de la muestra: 100 µL de hemolizado de eritrocitos + 900 µL de KCl 1,15 %.
- Esta dilución se centrifuga a 600 x g durante 10 min y se obtiene el sobrenadante que luego se utiliza en la reacción colorimétrica.
- Reacción colorimétrica. En tubos de ensayo de 10 mL, mezclar:
 - 100 µL de sobrenadante.
 - 100 µL de SDS 8,1% (preincubado).
 - 750 µL ácido acético 20% pH 3,5.
 - 750 µL solución de TBA 0,8% (preincubado).
 - 300 µL H₂O (en el blanco se reemplazan los 100 µL de sobrenadante por igual volumen de solución de KCl 1,15% y se continúa el mismo procedimiento).
- Incubar en baño de agua a 95°C durante 60 min. Posteriormente enfriar en agua durante 10 min.
- Agregar 500 µL H₂O a todos los tubos y agitar en Vortex.
- Agregar 2,5 mL de n-butanol-piridina a todos los tubos.
- Agitar vigorosamente sellando previamente con Parafilm.

- Centrifugar a 2862 x g durante 10 min.
- Aspirar al menos 2 mL de la fase orgánica (superior) con ayuda de una pipeta automática y transferir a tubos de ensayo que tienen la misma marca.
- Leer la absorbancia a 532 nm.
- Los resultados obtenidos se expresan en: nmoles MDA/g Hb.

6.4.2.2 Determinación de hemoglobina en el glóbulo rojo.

Se realizó añadiendo a la muestra de hemolizado de eritrocitos el reactivo de Drabkin, (NaHCO₃, KCN, K₃Fe(CN)₆, H₂O), el que al reaccionar con la muestra forma cianometahemoglobina, que da su máxima absorbancia a 540 nm.

Reactivos utilizados:

- Reactivo de Drabkin.
- Suero fisiológico.

Procedimiento:

- En el tubo blanco se agregan 40 µL de suero fisiológico.
- En cada tubo de muestra se agregan:
 - 5 mL de reactivo de Drabkin.
 - 20 µL de hemolizado de eritrocitos.
 - 20 µL de suero fisiológico
- Esperar 10 min y leer en espectrofotómetro a 540 nm.
- Los resultados obtenidos se expresan en: g Hb/mL de hemolizado.

6.4.2.3 Relación glutatión reducido/glutatión oxidado.

Se determinó por fluorimetría (Hissin y Hilf, 1976). La técnica se describe a continuación:

Reactivos utilizados:

- Ácido metafosfórico 25%.
- Tampón fosfato 0.1 M, EDTA 5 mM, pH 8,0.

- Solución de Oftalaldehído (OPT): Concentración 1 mg/mL. Preparar el volumen requerido para el protocolo de cada experimento disolviendo el reactivo en metanol.
- Solución de N-etilmaleimida (NEM): Concentración 5 mg/mL. Preparar el volumen requerido para el protocolo de cada experimento disolviendo el reactivo en Tampón fosfato pH 8,0.

Centrifugación:

- En tubos de ultracentrífuga se agregan 500 µL de hemolizado de eritrocitos + 6,3 mL de Tampón fosfato 0,1M EDTA 5 mM pH 8,0 + 1,7 ml de HPO₃ 25%. Se centrifugan a: 100.000 x g durante 30 min.
- Se obtiene el sobrenadante, que se utiliza para determinar GSH y GSSG.

Determinación de glutatión reducido (GSH):

- Dilución: En un tubo de ensayos colocar:
 - 3.000 µL de sobrenadante.
 - 1.500 µL de Tampón fosfato pH 8,0.
- Mezclar en Vortex.
- Reacción de desarrollo de fluorescencia: En un tubo de ensayos mezclar:
 - 25 µL de la dilución + 1875 µL de Tampón fosfato + 100 µL de OPT (el blanco lleva 1900 µL Tampón fosfato + 100 µL de OPT).
- Mezclar en Vortex e incubar a temperatura ambiente durante exactamente 15 min. Luego leer la fluorescencia a 420 nm (excitación a 350 nm).
- Los valores obtenidos se expresan en µg de GSH.

Determinación de glutatión oxidado (GSSG):

- Dilución: mezclar:
 - 250 µL de sobrenadante original.
 - 100 µL de NEM 0,04 M.
- Incubar a temperatura ambiente durante 30 min.
- Tomar 140 µL de la dilución + 860 µL de NaOH 0,1 N. Mezclar en Vortex.
- En tubo de ensayos pipetear:

- 100 μL de la mezcla anterior.
 - 1800 μL NaOH 0,1 N.
 - 100 μL solución de OPT (el blanco lleva 1900 μL de NaOH 0,1 N + 100 μL solución de OPT)
- Incubar a temperatura ambiente durante 15 min.
 - Leer la fluorescencia a 420 nm (excitación a 350 nm).
 - Los valores obtenidos se expresan en μg de GSSG.

6.4.2.4 Catalasa.

Se determinó por método espectrofotométrico siguiendo la cinética de descomposición del peróxido de hidrógeno a 240 nm (Aebi, 1974) y se calculó la constante cinética para la reacción de primer orden (k). La técnica consiste en:

Reactivos utilizados:

- Tritón etanol 10%: 300 μL de etanol absoluto + 300 μL de Tritón X-100 (sigma X100) y 2400 μL de Tampón fosfato 50 mM pH 7,0.
- Peróxido de hidrógeno 30 mM: 85 μL de peróxido de hidrógeno al 30% diluido en 25 mL de Tampón fosfato 50 mM pH 7,0.
- Tampón fosfato 50 mM pH 7,0.

Procedimiento:

- Se mezclan 450 μL de hemolizado de eritrocitos con 50 μL de Tritón etanol. Se agita en Vortex y se deja reposar en hielo durante 30 min.
- Transcurrido este tiempo se realiza la dilución mezclando 25 μL de esta muestra en 5 mL de Tampón fosfato 50 mM pH 7,0.

Ensayo no enzimático:

- En una cubeta de cuarzo agregar 3 mL de Tampón fosfato. Hacer un *scan blank* en el espectrofotómetro.
- Mezclar 2 mL de Tampón fosfato + 1 mL de peróxido de hidrógeno 30 mM. Agitar en Vortex y transferir a la cubeta de cuarzo. Registrar las lecturas a 240nm en intervalos de 5 ó 10 seg durante 1 min.

Ensayo enzimático:

- Mezclar 2 mL de muestra (dilución) + 1 mL de Tampón, transferir a cubeta de cuarzo y hacer un *scan blank* en el espectrofotómetro.
- Mezclar 2 mL de muestra (dilución) + 1 mL de H₂O₂ 30 mM. Agitar en Vortex y transferir inmediatamente a la cubeta de cuarzo para registrar las lecturas en la misma forma antes descrita.
- Finalmente los valores obtenidos de la actividad enzimática de CAT (pendiente de la curva semi logarítmica) se expresan en: k/g Hb.

6.4.2.5 Superóxido dismutasa.

Se midió la cinética de inhibición de la auto-oxidación de adrenalina a 480 nm por espectrofotometría (Misra y Fridovich, 1972). La técnica consiste en lo siguiente:

- Preparar solución de adrenalina 60 mM, pesando 55 mg de epinefrina, los que son diluidos en 5 mL de agua destilada, ajustando el pH a 2,0 con aproximadamente 7 μ L de ácido clorhídrico concentrado.

Centrifugación para obtención de la muestra:

- Transferir 6 mL de hemolizado de eritrocitos en tubos de 10 mL de policarbonato con tapa atornillada para la centrifugación.
- Contrapesar pares de tubos.
- Centrifugar en la ultracentrífuga a 100.000 x g durante 45 min.
- Obtener el sobrenadante (enzimas) y almacenar en tubos Eppendorf (1 mL) en freezer. Las muestras obtenidas mediante este procedimiento sirven para las determinaciones de las enzimas SOD y GSH-Px.

Dilución de la muestra:

- 100 μ L muestra + 900 μ L de KCl-Tris pH 7,4.

Procedimiento:

- Preparar un blanco con 2,95 mL de Tampón glicina 50 mM pH 10,2. Preincubar 2 a 3 min, para estabilizar el espectrofotómetro haciendo *scanblank*.

- Preparar 3 tubos con Tampón glicina 50 mM pH 10,2 por cada muestra con: 2,9 mL para el tubo 1; 2,87 mL para el tubo 2 y 2,85 mL para el tubo 3. Cada tubo se debe preincubar 2 a 3 min previa lectura.

Control:

- Agregar adrenalina 50 µL.
- Leer a 480 nm.

Muestra:

- Agregar dilución de la muestra en cada tubo de muestra en la siguiente cantidad: 50 µL para el tubo 1; 75 µL para el tubo 2 y 100 µL para el tubo 3 (se hace un *scan blank* en cada tubo antes de agregar adrenalina).
- Agregar adrenalina 50 µL.
- Leer a 480 nm.
- Se determina la pendiente de la inhibición de la auto-oxidación de la adrenalina. Una unidad de actividad de SOD corresponde a aquella que disminuye la auto-oxidación basal a la mitad.
- Finalmente la actividad enzimática de SOD se expresa en: U/g Hb.

6.4.2.6 Glutación peroxidasa.

Por técnica espectrofotométrica se midió la cinética de oxidación de NADPH acoplada a la reducción de GSSG a GSH, a 340 nm (Flohé y Günzler, 1984). La técnica se describe a continuación:

Reactivos utilizados:

- Glutación reductasa (2,4 U/mL): 8125 µL de Tampón fosfato pH 7,0 + 5 µL de glutación reductasa.
- Glutación 10 mM: 9,39 mg de glutación sigma G 4251 en 3 mL de agua destilada.
- NADPH 1,5 mM: 3,75 mg de NADPH en 3 mL de NaHCO₃. Precalentar en baño termorregulado a 37°C.
- Peróxido de hidrógeno 1,5 mM: 10 µL de peróxido de hidrógeno + 58,8 mL de agua destilada.

Dilución de la muestra:

- 200 μL de sobrenadante + 1000 μL de Tampón fosfato.

Ensayo no enzimático del blanco:

- En tubos de ensayo pipetear:
 - 600 μL de Tampón fosfato pH 7,0.
 - 100 μL de solución de glutatión reductasa.
 - 100 μL de solución de acida sódica.
 - 100 μL de solución de glutatión.
- Agitar en Vortex y preincubar 10 min a 37°C. Transferir a cubeta de cuarzo y realizar una *scan blank*. Regresar la solución al tubo.
- Agregar 100 μL de solución NADPH (preincubado a 37°C), agitar en Vortex y transferir a cubeta de cuarzo de 1 mL para iniciar el registro de lecturas.

Ensayo no enzimático de la muestra:

- En tubo de ensayos pipetear:
 - 500 μL de Tampón fosfato pH 7,0.
 - 100 μL de solución de glutatión reductasa.
 - 100 μL de solución de acida sódica.
 - 100 μL de solución de glutatión.
- Agitar en Vortex y preincubar 10 min a 37°C.
- Agregar:
 - 100 μL de solución de NADPH preincubada a 37°C.
 - 100 μL de solución de Peróxido de hidrógeno 1,5 mM.
- Agitar en Vortex y transferir a cubeta de cuarzo de 1 mL para iniciar el registro de lecturas.

Ensayo enzimático del blanco:

- En tubo de ensayos pipetear:
 - 500 μL de Tampón fosfato pH 7,0.
 - 100 μL de muestra.
 - 100 μL de solución de glutatión reductasa.

- 100 µL de solución de acida sódica.
- 100 µL de solución de glutatión.
- Agitar en Vortex y preincubar 10 min a 37°C. Transferir a cubeta de cuarzo y realizar un *scanblank*. Regresar la solución al tubo.
- Agregar 100 µL de solución NADPH preincubado a 37°C, agitar en Vortex y transferir a cubeta de cuarzo de 1 mL, para iniciar el registro de lecturas.

Ensayo enzimático de la muestra:

- En tubo de ensayos, pipetear:
 - 400 µL de Tampón fosfato pH 7,0.
 - 100 µL de muestra.
 - 100 µL de solución de glutatión reductasa.
 - 100 µL de solución de acida sódica.
 - 100 µL de solución de glutatión.
- Agitar en Vortex y preincubar 10 min a 37°C
- Agregar:
 - 100 µL de solución de NADPH precalentado a 37°C.
 - 100 µL de solución de Peróxido de hidrógeno 1,5 mM.
- Agitar en Vortex y transferir a cubeta de cuarzo de 1 mL para iniciar el registro de lecturas.
- Finalmente la actividad enzimática de GSH-Px se expresa en: U/g Hb.

6.5 Pesquisa de fibrilación auricular postoperatoria.

En el período post operatorio, los pacientes se mantendrán 2 días con monitorización electrocardiográfica continua. El tercer y cuarto día seguirán con Holter de ritmo continuo. En caso de sintomatología sugerente de arritmia se realizará un ECG hasta el alta. Todos estos registros son analizados en forma ciega por 2 arritmólogos externos.

6.6 Métodos estadísticos.

6.6.1 Determinación de valores normales de status antioxidante y biomarcadores de estrés oxidativo.

Serán establecidos en una muestra de controles sanos, es decir, sin alteración del ritmo ni enfermedades causantes de estrés oxidativo o inflamación, del mismo rango de edad que los pacientes que serán sometidos a cirugía cardíaca (n=34).

6.6.2 Cálculo del tamaño muestral.

Se utilizó la fórmula “*Tamaño de muestra para estimar diferencias entre medias*” (Snedecor y Cochran, 1986; Programa computacional Win episcopo 2.0).

Se estimó un aumento o disminución del 30% de las variables entre pacientes FAPO (-) y (+). Se calculó suponiendo un error α del 5% con un poder de 80%, lo que determina un tamaño muestral de 34 pacientes (valor de muestra más alto calculado para los valores de PCR-us).

6.6.3 Análisis estadístico.

Se realizó por medio de análisis de varianza (ANDEVA), complementado por el test de comparaciones de Tukey. Los resultados son expresados como promedios \pm desviación estándar. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un $p \leq 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Características de los pacientes.

El estudio se realizó sobre un total de 125 pacientes, de los cuales 99 no presentaron fibrilación auricular postoperatoria (FAPO -) y 26 si la presentaron (FAPO +).

En el grupo placebo de un total de 61 pacientes 20 presentaron FAPO, en el grupo suplementado de 64 pacientes sólo 6 presentaron FAPO, existiendo diferencias significativas entre ambos grupos ($p \leq 0,05$). Según estos resultados, la administración de suplemento disminuye aproximadamente un 20% el riesgo de presentar FAPO.

Las Tablas 1 y 2 muestran las características demográficas, las variables inflamatorias y de estrés oxidativo de pacientes placebo y suplementados respectivamente.

Tabla 1: Características demográficas, parámetros de variables inflamatorias y de estrés oxidativo de pacientes PLACEBO con y sin FAPO.

	FAPO (-) <i>(n = 41)</i>	FAPO (+) <i>(n = 20)</i>	<i>P</i>
Características demográficas			
Edad	58,0 ± 8,2	59,9 ± 5,8	0,35
Sexo M/F	35/6	18/2	1,00
Variables inflamatorias			
PCR-us (mg/dL)	21,37 ± 2,98	22,70 ± 4,00	0,16
Recuento de leucocitos (cél/μL)	8847 ± 1483	8134 ± 1099	0,06
Variables de estrés oxidativo			
Plasmáticas			
FRAP (μmol/L)	232 ± 39	209 ± 44	0,04
MDA (μmol/L)	2,59 ± 0,41	2,65 ± 0,42	0,60
F ₂ -isoprostanos (pg/mL)	23,43 ± 11,53	15,33 ± 4,91	0,28
Eritrocitos			
MDA (μmol/g Hb)	21,61 ± 3,21	22,26 ± 3,80	0,50
GSH/GSSG	9,49 ± 2,02	9,81 ± 2,78	0,61
CAT (k/g Hb)	520,24 ± 107,55	543,93 ± 107,75	0,67
SOD (U/g Hb)	662,14 ± 57,38	643,18 ± 107,55	0,69
GSH-Px (U/g Hb)	4,22 ± 0,58	4,16 ± 0,58	0,86

Los valores están expresados como promedios ± desviación estándar. M/F: masculino/femenino; PCR-us: proteína C reactiva ultrasensible; FRAP: capacidad antioxidante del plasma; MDA: malondialdehído; GSH/GSSG: glutatión reducido/glutatión oxidado; CAT: catalasa; SOD: superóxido dismutasa; GSH-Px: glutatión peroxidasa.

Tabla 2: Características demográficas, parámetros de variables inflamatorias y de estrés oxidativo de pacientes SUPLEMENTADOS con y sin FAPO.

	FAPO (-) (n = 58)	FAPO (+) (n = 6)	P
Características demográficas			
Edad	59,4 ± 9,9	59,7 ± 11,3	0,96
Sexo M/F	49/9	4/2	0,27
Variables inflamatorias			
PCR-us (mg/dL)	9,30 ± 3,22	10,48 ± 2,72	0,39
Recuento de leucocitos (cél/μL)	6693 ± 1716	6045 ± 1735	0,38
Variables de estrés oxidativo			
Plasmáticas			
FRAP (μmol/L)	272 ± 52	259 ± 31	0,55
MDA (μmol/L)	1,52 ± 0,36	1,52 ± 0,36	1,00
Eritrocitos			
MDA (μmol/g Hb)	12,30 ± 2,09	11,84 ± 1,89	0,64
GSH/GSSG	14,56 ± 1,30	14,42 ± 1,01	0,80

Los valores están expresados como promedios ± desviación estándar. M/F: masculino/femenino; PCR-us: proteína C reactiva ultrasensible; FRAP: capacidad antioxidante del plasma; MDA: malondialdehído; GSH/GSSG: glutatión reducido/glutatión oxidado.

7.2 Variables inflamatorias.

7.2.1 Proteína C reactiva ultrasensible.

La Figura 2 muestra la asociación entre la suplementación y la ocurrencia de FAPO en relación a los valores de concentración plasmática de PCR-us. La administración de suplemento disminuyó el riesgo de FAPO. La suplementación disminuyó los valores de la PCR-us y de ocurrencia de FAPO ($p \leq 0,05$) sin embargo, no hubo diferencias significativas en los niveles de PCR-us en los grupos placebo ni suplementado.

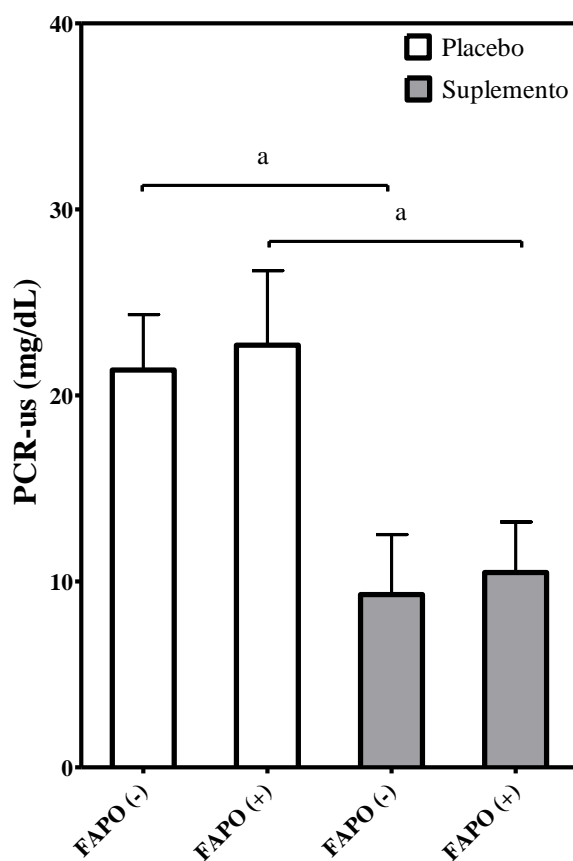


Figura 2: Proteína C reactiva ultrasensible medida en el post operatorio en pacientes placebos y suplementados, con y sin fibrilación auricular postoperatoria (FAPO + y -).

Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar; ^a $p \leq 0,05$ placebo vs suplemento.

7.2.2 Recuento de leucocitos.

La Figura 3 muestra la asociación entre la suplementación y la ocurrencia de FAPO en relación al recuento de leucocitos. La administración de suplemento disminuyó el riesgo de FAPO. La suplementación disminuyó el recuento de leucocitos y la ocurrencia de FAPO ($p \leq 0,05$) sin embargo, no hubo diferencias significativas en el recuento de leucocitos en los grupos placebo ni suplementado.

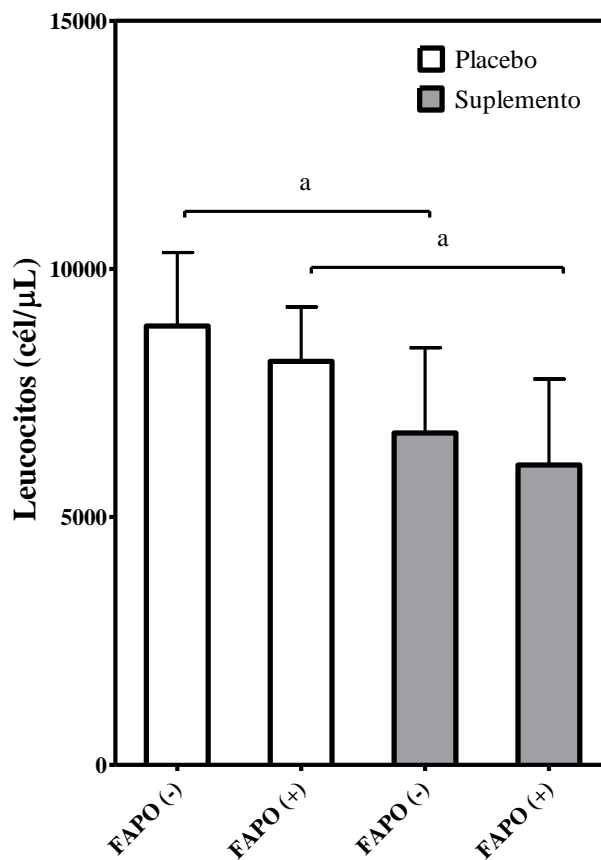


Figura 3: Recuento de leucocitos medido en el post operatorio en pacientes placebos y suplementados, con y sin fibrilación auricular postoperatoria (FAPO + y -). Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar; ^a $p \leq 0,05$ placebo vs suplemento.

7.3 Variables de estrés oxidativo.

7.3.1 Plasmáticas.

7.3.1.1 Capacidad antioxidante del plasma.

La Figura 4 muestra la asociación entre la suplementación y la ocurrencia de FAPO en relación a la FRAP. La administración de suplemento disminuyó el riesgo de FAPO. La suplementación aumentó la FRAP y disminuyó la ocurrencia de FAPO ($p \leq 0,05$) sin embargo, no hubo diferencias significativas en la FRAP en los grupos placebo ni suplementado.

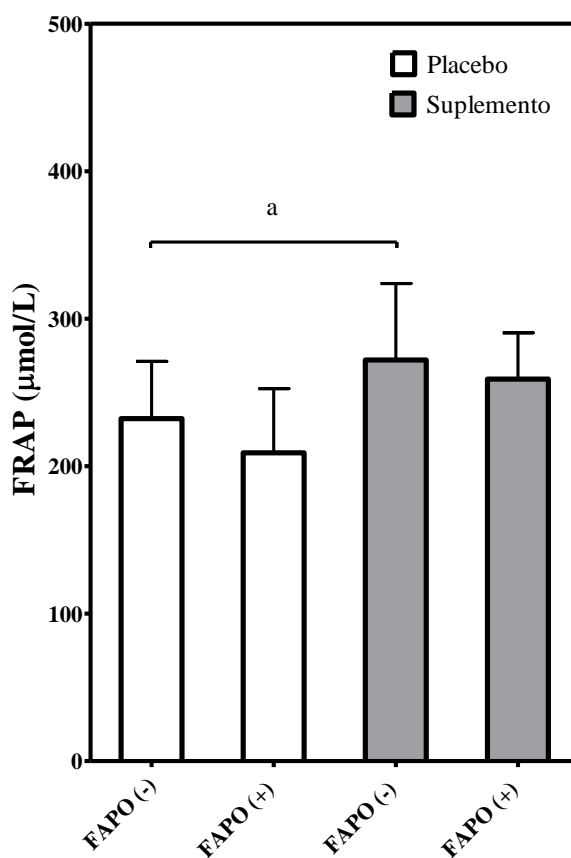


Figura 4: Capacidad antioxidante del plasma medida en el post operatorio en pacientes placebos y suplementados, con y sin fibrilación auricular postoperatoria (FAPO + y -). Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar; ^a $p \leq 0,05$ placebo vs suplemento.

7.3.1.2 Malondialdehído en plasma.

La Figura 5 muestra la asociación entre la suplementación y la ocurrencia de FAPO en relación a los niveles de MDA en plasma. La administración de suplemento disminuyó el riesgo de FAPO. La suplementación disminuyó los niveles de MDA en plasma y la ocurrencia de FAPO ($p \leq 0,05$) sin embargo, no hubo diferencias significativas en los niveles de MDA en plasma en los grupos placebo ni suplementado.

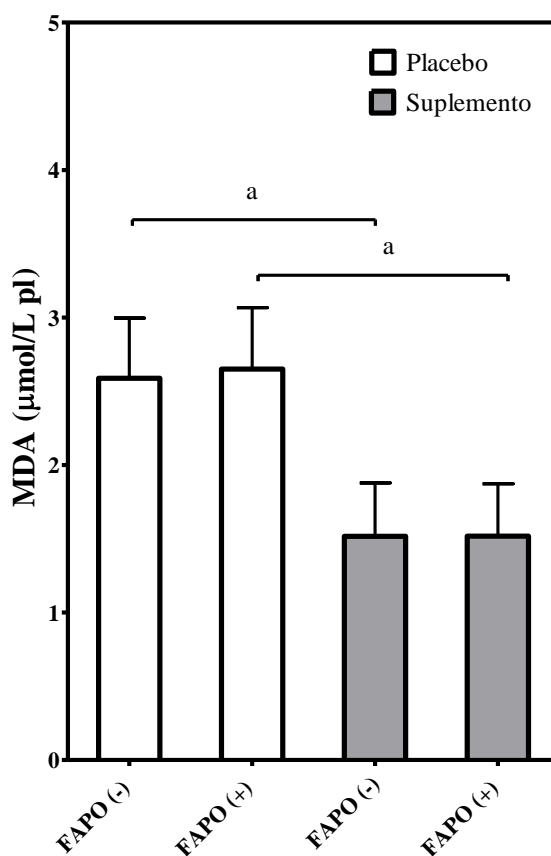


Figura 5: Niveles plasmáticos de MDA medidos en el post operatorio en pacientes placebos y suplementados, con y sin fibrilación auricular postoperatoria (FAPO + y -). Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar; ^a $p \leq 0,05$ placebo vs suplemento.

7.3.1.3 F₂-isoprostanos.

Las concentraciones plasmáticas de F₂-isoprostanos no mostraron diferencias significativas entre los pacientes FAPO (+) y FAPO (-). Sin embargo, el número de datos disponibles fue insuficiente en el período de observación para extraer conclusiones.

7.3.2 Eritrocitos.

7.3.2.1 Malondialdehído en eritrocitos.

La Figura 6 muestra la asociación entre la suplementación y la ocurrencia de FAPO en relación a los niveles de MDA en eritrocitos. La administración de suplemento disminuyó el riesgo de FAPO. La suplementación disminuyó los niveles de MDA en eritrocitos y la ocurrencia de FAPO ($p \leq 0,05$) sin embargo, no hubo diferencias significativas en los niveles de MDA en eritrocitos en los grupos placebo ni suplementado.

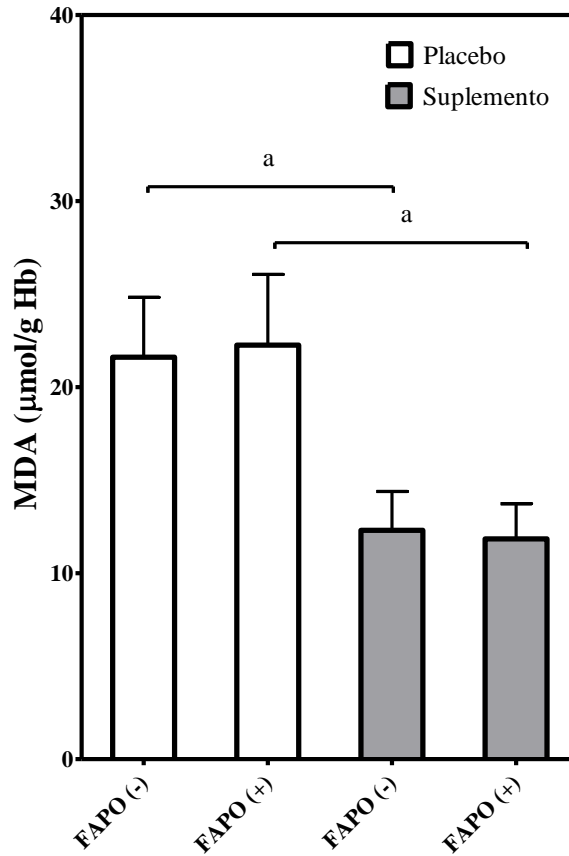


Figura 6: Niveles de MDA medidos en eritrocitos en el post operatorio en pacientes placebos y suplementados, con y sin fibrilación auricular postoperatoria (FAPO + y -). Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar; ^a $p \leq 0,05$ placebo vs suplemento.

7.3.2.2 Relación glutatión reducido/glutatión oxidado.

La Figura 7 muestra la asociación entre la suplementación y la ocurrencia de FAPO con respecto a la relación GSH/GSSG en eritrocitos. La administración de suplemento disminuyó el riesgo de FAPO. La suplementación aumentó la relación GSH/GSSG y disminuyó la ocurrencia de FAPO ($p \leq 0,05$) sin embargo, no hubo diferencias significativas en la relación GSH/GSSG en los grupos placebo ni suplementado.

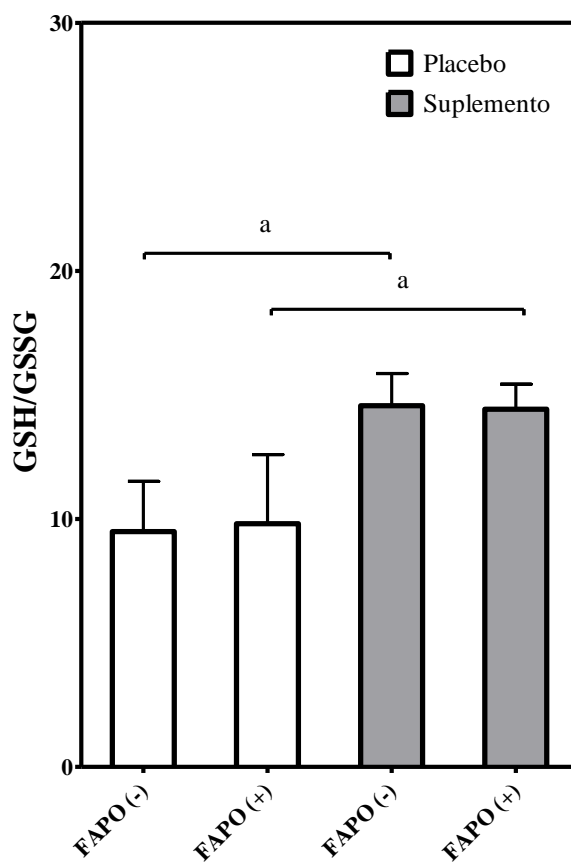


Figura 7: Relación glutatión reducido/oxidado medida en el post operatorio en pacientes placebos y suplementados, con y sin fibrilación auricular postoperatoria (FAPO + y -). Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar; ^a $p \leq 0,05$ placebo vs suplemento.

7.3.2.3 Catalasa.

La Figura 8 muestra la actividad de la enzima catalasa en eritrocitos de pacientes con y sin FAPO en el pre- y postoperatorio. Tanto en el período preoperatorio como en el postoperatorio no existieron diferencias significativas entre pacientes FAPO (-) y (+).

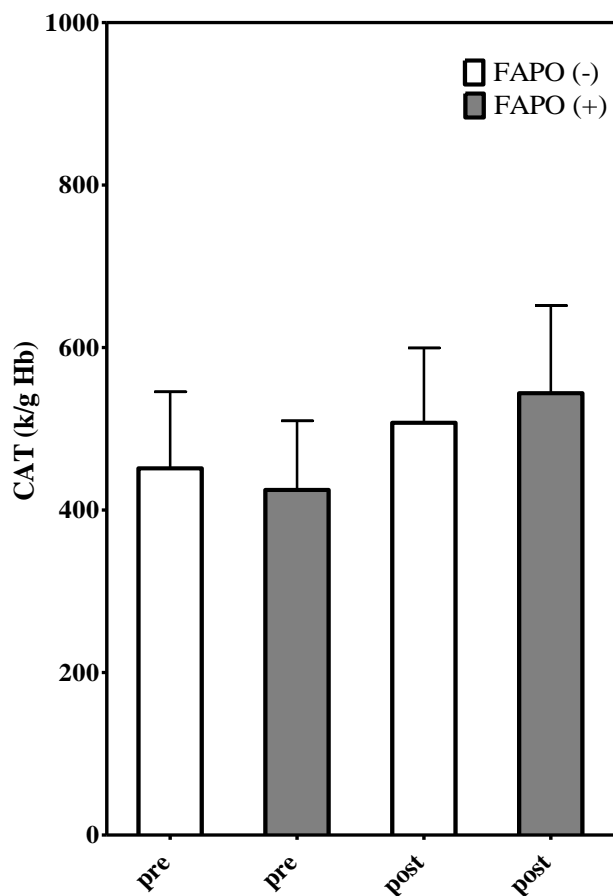


Figura 8: Actividad enzimática de CAT en eritrocitos medida en el pre- y post operatorio en pacientes con y sin fibrilación auricular postoperatoria (FAPO + y -). Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar.

7.3.2.4 Superóxido dismutasa.

La Figura 9 muestra la actividad de la enzima superóxido dismutasa en eritrocitos de pacientes con y sin FAPO en el pre- y postoperatorio. Tanto en el período preoperatorio como en el postoperatorio no existieron diferencias significativas entre pacientes FAPO (-) y (+). Sin embargo, en el período postoperatorio existe un aumento de 72,65% y 117,90% con respecto al preoperatorio en pacientes FAPO (-) y (+) respectivamente, existiendo una diferencia significativa entre estos grupos ($p \leq 0,05$).

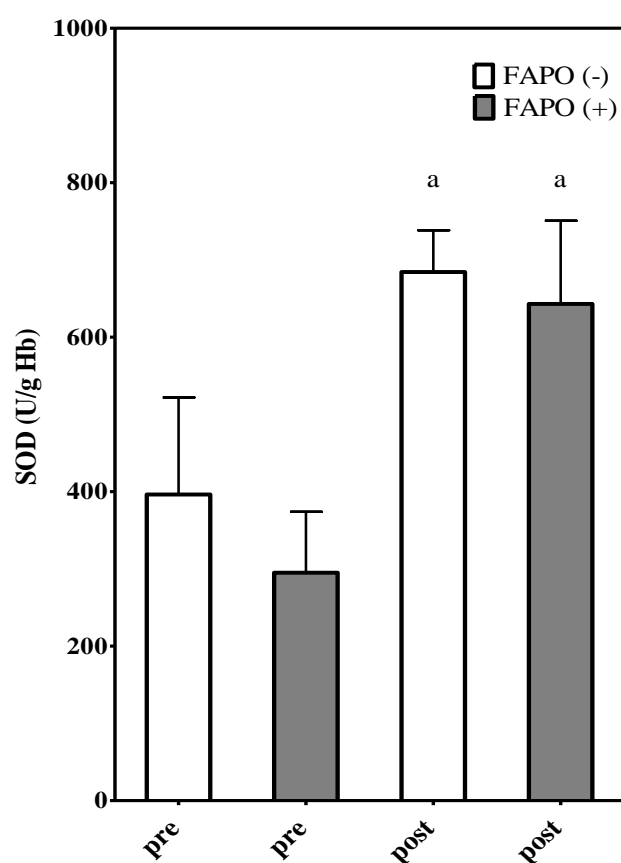


Figura 9: Actividad enzimática de SOD en eritrocitos medida en el pre- y post operatorio en pacientes con y sin fibrilación auricular postoperatoria (FAPO + y -). Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar; ^a $p \leq 0,05$ preoperatorio vs postoperatorio.

7.3.2.5 Glutación peroxidasa.

La Figura 10 muestra la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en eritrocitos de pacientes con y sin FAPO en el pre- y postoperatorio. Tanto en el período preoperatorio como en el postoperatorio no existieron diferencias significativas entre pacientes FAPO (-) y (+).

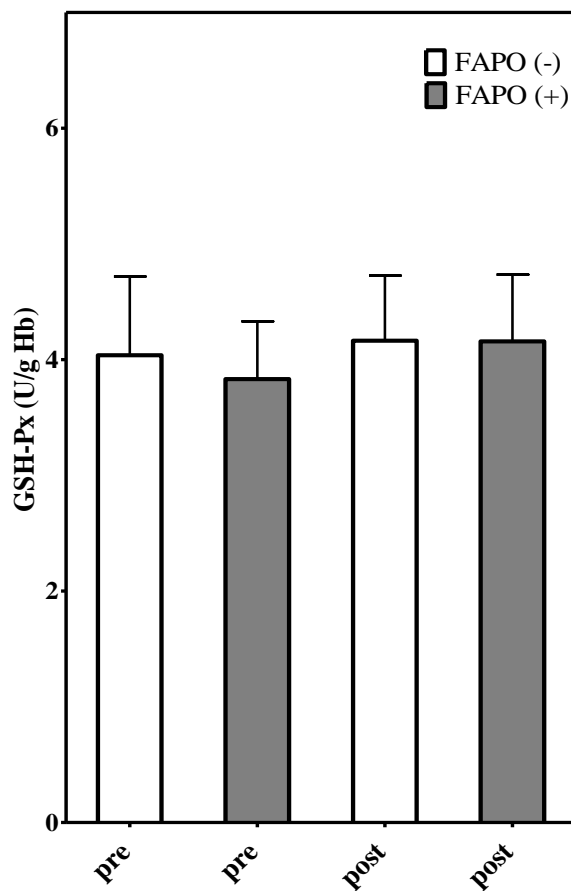


Figura 10: Actividad enzimática de GSH-Px en eritrocitos medida en el pre- y post operatorio en pacientes con y sin fibrilación auricular postoperatoria (FAPO + y -). Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar.

8. DISCUSIÓN

Este estudio proporciona información acerca de la influencia ejercida por el estrés oxidativo y la inflamación que podría explicar el mecanismo de la FAPO, medido a través de variables relacionadas con defensas antioxidantes, biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación.

El hecho de que la suplementación haya provocado una disminución de la lipoperoxidación (Fig. 5 y 6) señala que ésta logró disminuir el estrés oxidativo. Este resultado podría explicarse por un mayor nivel de defensas antioxidantes en los pacientes suplementados, ya que la relación GSH/GSSH fue mayor en este grupo (Fig. 7). Esto mismo sucede con la capacidad antioxidante del plasma (Fig. 4). Esto coincide con lo demostrado en un estudio en el que pacientes sometidos a cirugía cardiaca aumentaron sus niveles de lipoperoxidación en plasma y también disminuyó la concentración de glutatión cardiaco (De Vecchi *et al.*, 1998).

Es importante señalar que la capacidad antioxidante del plasma también puede contribuir a explicar la menor vulnerabilidad de los pacientes FAPO (-) suplementados, ya que los valores de la FRAP de este grupo fueron mayores que los valores de los pacientes FAPO (-) placebo (Fig. 4). Los mayores niveles de FRAP en el grupo suplementado podrían ser el resultado de una activación de las defensas antioxidantes enzimáticas en los tejidos nucleados, ya que existe un estudio que sugiere que la suplementación de ácidos grasos poliinsaturados (omega 3) puede aumentar las defensas antioxidantes enzimáticas y así reducir la incidencia de FAPO (Calo *et al.*, 2005). Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como EPA y DHA son capaces de generar un estrés oxidativo de baja intensidad, pero suficiente para gatillar un estímulo de los mecanismo de defensa enzimática antioxidante. Esta respuesta se ve favorecida por la activación del factor de transcripción Nrf2 que actúa sobre los elementos de respuesta antioxidante (ERA) (Gao *et al.*, 2007).

La ausencia de cambios en las enzimas antioxidantes en ambos grupos podría obedecer a la falta de una respuesta genómica en los eritrocitos frente al estímulo de los radicales libres.

Con respecto a la participación de la inflamación en el mecanismo fisiopatológico de la fibrilación auricular los resultados muestran que la suplementación disminuyó los niveles de PCR-us y el recuento de leucocitos, lo cual podría señalar un menor riesgo de FAPO a través de este mecanismo. Estos datos son concordantes con un estudio previo que reveló que pacientes con elevados niveles de PCR-us tienen un mayor riesgo de presentar FAPO (Aviles *et al.*, 2003), ya que el aumento de especies reactivas del oxígeno también favorece la activación del proceso inflamatorio. Estos resultados son concordantes con los valores de lipoperoxidación en ambos grupos. La respuesta inflamatoria sistémica generada por la cirugía cardíaca produce activación y transmigración de leucocitos y liberación de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión que dañan el tejido (Cave *et al.*, 2005). Esto remodela eléctrica y estructuralmente el tejido cardíaco, alterando la propagación normal del impulso eléctrico desencadenando la FA. Además, se ha demostrado que los linfocitos activados pueden modificar directamente la actividad eléctrica de los miocitos cardíacos (Binah, 2002).

Con los resultados aquí obtenidos se confirma que la cirugía cardíaca con circulación extracorpórea da lugar a producción de estrés oxidativo e inflamación respecto del estado preoperatorio. Ambos procesos pueden relacionarse con la ocurrencia de FAPO en forma tal que los pacientes que la presentaron exhibieron mayores concentraciones de biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación y menores de potencial antioxidante en el período postoperatorio temprano respecto de los pacientes suplementados. Sin embargo, los resultados de este estudio no mostraron diferencias significativas entre la PCR-us y los F₂-isoprostanos al comparar pacientes FAPO (+) vs FAPO (-), lo cual se podría explicar por un número muy reducido de pacientes que resultó FAPO (+) en el grupo suplementado (n=6), representando una limitación para el presente estudio.

En resumen, sobre la base de estos resultados se podría sugerir que ambos factores relacionados con la patogenia de la FAPO podrían ser atenuados mediante el reforzamiento del sistema de defensas antioxidantes y así poder reducir la vulnerabilidad del tejido miocárdico a la ocurrencia de la arritmia.

9. CONCLUSIONES

La participación del estrés oxidativo y el proceso inflamatorio en el mecanismo fisiopatológico de la FAPO puede explicarse sobre la base de los siguientes hallazgos presentes en la sangre obtenida después de la cirugía en los pacientes suplementados:

1. Mayores niveles de capacidad antioxidante plasmática.
2. Menores niveles de lipoperoxidación en plasma y eritrocitos.
3. Mayores niveles de relación GSH/GSSG en eritrocitos.
4. Menores niveles plasmáticos de PCR-us.

Puesto que los radicales libres son capaces de activar la respuesta inflamatoria representando una vía común para el estrés oxidativo y la inflamación, se podría sugerir que el reforzamiento del sistema de defensa antioxidante a través de sus componentes enzimáticos y no enzimáticos podría resultar en una disminución de la ocurrencia de la arritmia.

10. REFERENCIAS

1. **Aebi H.** 1974. Catalase In: Methods in Enzymatic Analysis. Bergmeyer H.U. 29th ed. Academic Press, New York pp. 673 - 678.
2. **Antzelevitch C, Markides.** 2005. Modulation of transmural repolarization. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1047: 314 - 23.
3. **Aviles RJ, Martin DO, Apperson-Hanson C.** 2003. Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. Circulation. 108: 3006 - 3010.
4. **Baeuerle PA, Henkel T.** 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. Annu. Rev. Immunol. 12: 141 - 179.
5. **Benzie I, Strain J.** 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. Anal. Biochem. 239: 70 - 76.
6. **Binah O.** 2002. Cytotoxic lymphocytes and cardiac electrophysiology. J. Mol. Cell. Cardiol. 34: 1147 - 1161.
7. **Bosch RF, Scherer CR, Rub N, Wohrl S, Steinmeyer K, Haase H, Busch AE, Seipel L, Kuhlkamp V.** 2003. Molecular mechanisms of early electrical remodeling: transcriptional downregulation of ion channel subunits reduces I_{Ca} L and I_{to} in rapid atrial pacing in rabbits. J. Am. Coll. Cardiol. 41: 858 - 869.
8. **Calo L, Bianconi L, Colivicchi F.** 2005. N-3 Fatty acids for the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a randomized, controlled trial. J. Am. Coll. Cardiol. 45: 1723 - 1728.

9. **Carnes CA, Chung MK, Nakayama T.** 2001. Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ. Res.* 89: E32 - E38.
10. **Cave AC, Grieve DJ, Johar S, Zhang M, Shah AM.** 2005. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. *Phil. Trans. Royal Soc.* 360: 2327 - 2334.
11. **Collins C, Quaggiotto P, Wood L, O'Loughlin E, Henry R, Garg M.** 1999. Elevated plasma levels of F2 α isoprostane in cystic fibrosis. *Lipids* 34: 551 - 556.
12. **Daubert JC, Mabo P.** 2000. Atrial pacing for the prevention of postoperative atrial fibrillation: how and where to pace? *J. Am. Coll. Cardiol.* 35: 1423 - 1427.
13. **De Vecchi E, Pala MG, Di Credico G, Agape V, Paolini G, Bonini PA, Grossi A, Paroni R.** 1998. Relation between left ventricular function and oxidative stress in patients undergoing bypass surgery. *Heart* 79: 242 - 247.
14. **Dudley SC Jr, Hoch NE, McCann LA, Honeycutt C, Diamandopoulos L, Fukai T, Harrison DG, Dikalov SI, Langberg J.** 2005. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation* 112: 1266 - 1273.
15. **Flohé L, Günzler W.** 1984. Assays of glutathione peroxidase. In: Colowic SP, Kaplan NO (Eds.). *Methods in Enzymology* Vol. 105. Academic Press, New York pp. 114 - 121.
16. **Gao L, Wang J, Sekhar KR, Yin H, Yared NF, Schneider SN, Sasi S, Dalton TP, Anderson ME, Chan JY, Morrow JD, Freeman ML.** 2007. Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. *J. Biol. Chem.* 282: 2529 - 37.

17. **Goette A, Lendeckel O.** 2004. Nonchannel drug targets in atrial fibrillation. *Pharm. Therap.* 109: 363 - 8.
18. **Grieve D, Shah A.** 2003. Oxidative stress in heart failure. *Eur. Heart J.* 24: 2161 - 2163.
19. **Hatzinikolaou-Kotsakou E, Tziakas D, Hotidis A, Stakos D, Floros D, Papanas N, Chalikias G, Maltezos E, Hatseras DI.** 2006. Relation of C-reactive protein to the first onset and the recurrence rate in lone atrial fibrillation. *Am. J. Cardiol.* 97: 659 - 661.
20. **Hersi A, Wyse D.** 2005. Management of atrial fibrillation. *Curr. Probl. Cardiol.* 30: 175 - 233.
21. **Hissin P, Hilf R.** 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74: 214 - 226.
22. **Kawano S, Kubota T, Monden Y, Tsutsumi T, Inoue T, Kawamura N, Tsutsui H, Sunagawa K.** 2006. Blockade of NF- κ B improves cardiac function and survival after myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*
23. **Kim YH, Lim do S, Lee JH, Shim WJ, Ro YM, Park GH, Becker KG, Cho-Chung YS, Kim MK.** 2003. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Exp. Mol. Med.* 35: 336 - 49.
24. **Korantzopoulos P, Kolettis T, Siogas K, Goudevenos J.** 2003. Atrial fibrillation and electrical remodeling: the potential role of inflammation and oxidative stress. *Med. Sci. Monit.* 9: RA225 - 229.
25. **Lamm G, Auer J, Weber T, Berent R, Ng C, Eber B.** 2006. Postoperative white blood cell count predicts atrial fibrillation after cardiac surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 20: 51 - 6.

26. **Levy S, Sbragia P.** 2005. Remodelling in atrial fibrillation. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 98: 308 - 312.
27. **Macy EM, Hayes TE, Tracy RP.** 1997. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. *Clin. Chem.* 43: 52 - 8.
28. **Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR, Bauer JA.** 2001. Impaired myofibrillar energetic and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* 104: 174 - 180.
29. **Misra H, Fridovich I.** 1972. The role of superoxide anion in the antioxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170 - 3175.
30. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351 - 358.
31. **Pavlović D, Dordević V, Kocić G.** 2002. A "cross-talk" between oxidative stress and redox cell signalling. *Medicine and Biology* 2: 131 - 137.
32. **Pradelles P, Grassi J, Maclouf J.** 1985. Enzyme immunoassay of eicosanoids using AchE as label. An alternative to radioimmunoassay. *Anal. Chem.* 57: 1170 - 1173.
33. **Reznick AZ, Packer L.** 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. In: *Methods Enzimol.* 233: 357 - 363.
34. **Roden DM.** 2004. Human genomics and its impact on arrhythmias. *Trends Cardiovasc. Med.* 14: 112 - 116.

35. **Rodrigo R, Vinay J, Castillo R, Cereceda M, Asenjo R, Zamorano J, Araya J, Castillo-Koch R, Espinoza J, Larraín E.** 2010. Use of vitamins C and E as a prophylactic therapy to prevent postoperative atrial fibrillation. *Int. J. Cardiol.* 138: 221 - 8.
36. **Scherr K, Jensen L, Smith H, Kozak CL.** 2006. Atrial fibrillation following cardiac surgery: a retrospective cohort series. *Prog. Cardiovasc. Nurs.* 21: 7 - 23.
37. **Schoonderwoerd BA, Van Gelder IC, Van Veldhuisen DJ, Van den Berg MP, Crijns HJ.** 2005. Electrical and structural remodeling: role in the genesis and maintenance of atrial fibrillation. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 48: 153 - 168.
38. **Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H.** 2004. Over expression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation* 109: 544 - 549.
39. **Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Nattel S.** 2005. Atrial fibrillation: basic mechanisms, remodeling and triggers. *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 13: 181 - 193.
40. **Snedecor G, Cochran W.** 1986. *Statistical methods* 7^a edition. The Iowa State University Press. ISBN. 8138: 1560 - 1566.
41. **Thijssen V, Ausma J, Borgers M.** 2001. Structural remodeling during chronic atrial fibrillation: act of programmed cell survival. *Cardiovasc. Res.* 52: 14 - 24.
42. **Tselentakis EV, Woodford E, Chandy J.** 2006. Inflammation effects on the electrical properties of atrial tissue and inducibility of postoperative atrial fibrillation. *J. Surg. Res.* 135: 68 - 75.
43. **Van Wagoner DR.** 2003. Electrophysiological remodeling in human atrial fibrillation. *Pac. Clin. Electrophysiol.* 26: 1572 - 1575.

44. **Van Wagoner DR.** 2008. Oxidative stress and inflammation in atrial fibrillation: role in pathogenesis and potential as a therapeutic target. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 52: 306 - 13.
45. **Veenhuyzen GD, Simpson CS, Abdollah H.** 2004. Atrial fibrillation *CMAJ.* 171: 755 - 760.
46. **Yamamoto Y, Gaynor RB.** 2001. Role of NF-kB pathway in the pathogenesis of human disease states. *Curr. Mol. Med.* 1: 287 - 296.