



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



**VALIDACIÓN DE INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN  
ERITROCITOS PARA EL ANÁLISIS DEL ESTATUS  
ANTIOXIDANTE/PROXIDANTE DEL TEJIDO AURICULAR EN UN  
MODELO DE PRE-ACONDICIONAMIENTO MIOCÁRDICO NO  
HIPÓXICO**

**ROBERTO ANDRÉS NAVARRETE AMPUERO**

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

**PROFESOR GUIA: Prof. Dr. RAMÓN RODRIGO SALINAS**

SANTIAGO, CHILE  
2011



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



**VALIDACIÓN DE INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN  
ERITROCITOS PARA EL ANÁLISIS DEL ESTATUS  
ANTIOXIDANTE/PROXIDANTE DEL TEJIDO AURICULAR EN UN  
MODELO DE PRE-ACONDICIONAMIENTO MIOCÁRDICO NO  
HIPÓXICO**

**ROBERTO ANDRÉS NAVARRETE AMPUERO**

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

NOTA FINAL: \_\_\_\_\_

PROFESOR GUIA : RAMÓN RODRIGO SALINAS  
PROFESOR CONSEJERO : HÉCTOR ADARMES  
PROFESOR CONSEJERO : VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ

NOTA	FIRMA
_____	_____
_____	_____
_____	_____

SANTIAGO, CHILE  
2011

## RESUMEN

**Antecedentes de la investigación.** Las especies reactivas de oxígeno (ERO), estarían involucradas en la producción de modificaciones estructurales y eléctricas, que hacen susceptible al tejido auricular a arritmias y disfunción contráctil. Por lo tanto, un reforzamiento del sistema de defensa antioxidante protegería al corazón del daño hipóxico generado por las especies reactivas al oxígeno en la cirugía cardíaca no congénita con circulación extracorpórea.

**Hipotesis.** En pacientes sometidos a cirugía de cardiopatías no congénitas, la suplementación previa con ácidos grasos omega-3 y vitaminas antioxidantes C y E, reduce la ocurrencia de fibrilación auricular postoperatoria (FAPO).

**Métodos.** En un ensayo clínico doble-ciego, se separaron al azar 90 pacientes en dos grupos, a placebo o con una dosis diaria de omega 3, desde 7 días previos a la cirugía programada. Dos días antes de la cirugía se adicionó la suplementación de vitaminas (C y E). Estos 3 suplementos/placebos se administraron en forma ininterrumpida hasta el alta. Se obtuvieron muestras de sangre: previo a la incorporación de las vitaminas antioxidantes, al momento de la intervención quirúrgica, y postoperatoria temprana para la determinación del **estatus antioxidante** (relación glutatión reducido (GSH)/oxidado (GSSG), enzimas antioxidantes) y del **estatus prooxidante** (biomarcadores de estrés oxidativo (malondialdehído y carbonilación proteica). En el acto quirúrgico se obtuvo tejido auricular (orejuela derecha) conservado en nitrógeno para su posterior análisis bioquímico del **estatus antioxidante/proxidante**. Se compararon a través del test de Student y el estudio de correlaciones se realizó de acuerdo al test de Pearson.

**Resultados.** El uso de omega-3 y vitaminas antioxidantes atenuarían el daño oxidativo, logrando con la suplementación bajo este protocolo, una disminución en un 68,5% de la FAPO, junto con menores valores de biomarcadores de estrés oxidativo tanto en eritrocitos como en el tejido auricular, sumado a un mayor nivel de relación Glutatión (GSH/GSSG) en eritrocitos y mayor respuesta al estrés oxidativo de Superóxido dismutasa (SOD) eritrocitaria postoperatoria temprano y Glutatión peroxidasa (GSH-Px) operatoria en tejido auricular principalmente.

**Conclusiones.** La suplementación con omega-3 y vitaminas antioxidantes atenúa el daño oxidativo en pacientes sometidos a cirugía cardíaca con CEC. Evidenciando posterior a la cirugía en el grupo suplementado una mayor actividad enzimática, in aumento de la relación de glutatión, y menores índices de biomarcadores de estrés oxidativo.

Palabras claves: cirugía cardíaca, estrés oxidativo, tejido auricular, fibrilación auricular.

Tesis financiada por Proyecto Fondecyt: 1070948

## **ABSTRACT**

**Background.** Reactive oxygen species (ROS) might be involved in the production of structural and electrical changes, which are susceptible to arrhythmias and atrial tissue to contractile dysfunction. Therefore, a strengthening of the antioxidant defense system would protect the heart from hypoxic damage generated by ROS in non-congenital cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CPB).

**Hypothesis.** In patients undergoing surgery for congenital heart disease does not, after supplementation with omega-3 fatty acids and antioxidant vitamins C and E reduce the occurrence of postoperative atrial fibrillation (PAF).

**Materials and Methods.** In a randomized, double-blind study, 90 patients were randomly separated into two groups, a placebo or a daily dose of omega 3 from 7 days prior to scheduled surgery. Two days before surgery, supplements of vitamins (C and E) was added. These 3 supplements / placebo were administered continuously until discharge. Blood samples were obtained: prior to the addition of antioxidant vitamins at the time of surgery, and early postoperative to determine the **antioxidant status** (reduced glutathione ratio (GSH) / oxidized (GSSG), antioxidant enzymes) and **proxidante status** (biomarkers of oxidative stress / malondialdehyde and protein carbonylation). During surgery, atrial tissue was obtained (right atrial appendage) and kept in nitrogen for subsequent biochemical analysis of **antioxidant/proxidante status**. Results were compared by Student's test, and correlation study was performed according to Pearson test.

**Results:** The use of omega-3 and antioxidant vitamins attenuated the oxidative damage, achieved under this protocol, a decrease by 68.5 % of the PAF, with lower values of biomarkers of oxidative stress in erythrocytes and in the atrial tissue, coupled with higher levels of glutathione ratio (GSH / GSSG) in erythrocytes and increased oxidative stress response of superoxide dismutase (SOD) and early postoperative erythrocyte glutathione peroxidase (GSH-Px) in atrial tissue mainly operative.

**Conclusions:** Supplementation with omega-3 and antioxidant vitamins attenuates the oxidative damage in patients undergoing cardiac surgery with CPB. After surgery showing in the supplemented group increased enzyme activity, increased glutathione ratio, and lower levels of oxidative stress biomarkers.

**Key words:** cardiac surgery, oxidative stress, atrial tissue, atrial fibrillation.

Proyecto Fondecyt: 1070948

## 1.-INTRODUCCIÓN

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia más frecuente en la población adulta. Actualmente existe considerable evidencia acerca de la participación del estrés oxidativo 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 antiarrítmicos actualmente disponible sólo ofrece beneficios subóptimos y no está exento 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; junto a ello una disminución temporal de la perfusión cardíaca, dando lugar a un ciclo isquemia/reperfusión, reconocida causa de producción de radicales libres, responsables del estrés oxidativo que sufre la masa miocárdica. Tanto las enzimas antioxidantes (Catalasa, Superóxido dismutasa y Glutación peroxidasa) como las sustancias antioxidantes endógenas y exógenas (glutación, vitamina C,  $\alpha$ -tocoferol) participan de la defensa del miocardio contra la isquemia/reperfusión. Por lo tanto, resulta razonable asumir que un reforzamiento de ambos componentes del sistema de defensas antioxidantes disminuya la vulnerabilidad del miocardio frente al estrés oxidativo creado durante la cirugía cardíaca.

Esfuerzos orientados en este sentido han conducido a la obtención de un aumento de actividad de las enzimas antioxidantes, en un modelo experimental en ratas pretratadas con ácidos grasos omega-3 (PUFA n-3), lo que resulta en un precondicionamiento del tejido miocárdico al haberse creado una condición de estrés oxidativo de baja intensidad que favorece las señales de supervivencia a nivel celular y tisular (Jahangiri *et al.*, 2006). Por otra parte, el pretratamiento de este tipo de pacientes con vitamina C también ha logrado reducir las tasas de FAPO. Junto a ello se ha observado que la suplementación con vitamina E ejerce un papel protector de las estructuras y funciones de las membranas celulares de los tejidos contráctiles expuestos al estrés oxidativo propios de carrera de larga duración, en equinos de deporte. Sin embargo, aún no se ha presentado un diseño metodológico sustentado por una caracterización fisiopatológica y molecular acerca del uso de la asociación de ambos agentes, que pueda ser recomendado para su aplicación en la prevención de la FAPO.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia cardiaca 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 cardiovascular, 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 postoperatoria es habitualmente precoz, dentro de las primeras 24 a 48 horas, y su duración puede ser de horas a días (Hogue y Hyder, 2000). Se han realizado intentos por prevenir este trastorno mediante fármacos y uso de marcapasos durante el período perioperatorio, pero los resultados no son satisfactorios. Entre los factores precipitantes, de este tipo de arritmia, se han considerado la participación de cambios inflamatorios y de estrés oxidativo propios de la cirugía (Korantzopoulos *et al.*, 2003). La isquemia tisular/reperfusión a la que inevitablemente se verá sometido el tejido cardíaco durante la circulación extracorpórea, dará lugar a una elevación en la concentración de radicales libres en el estado estacionario (estrés oxidativo), los cuales se constituirán en mensajeros intracelulares capaces de inducir la expresión de genes proinflamatorios (Kawano *et al.*, 2006).

El estrés oxidativo, a causa de la formación de peroxinitrito, dará lugar a procesos de lipoperoxidación y a la nitración de residuos tirosina con el consiguiente cambio estructural de las proteínas de 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. 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 (Lévy & 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.

En modelos animales se demostró que la FA cambia las propiedades electrofisiológicas del atrio, facilitando la mantención de la FA. Sin embargo, el remodelado eléctrico es reversible y retornan las propiedades electrofisiológicas normales dentro de tres días posteriores a la restauración del ritmo sinusal, aún en cuadros de FA prolongada (Thijssen *et al.*, 2001). Se ha postulado también, 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 2 a 3 días luego de restablecido el ritmo sinusal. En casos de FA prolongada (semanas a meses), el período refractario se normaliza en unos pocos días. En cambio, la recuperación de la actividad contráctil puede tomar meses (Van Wagoner, 2003).

Por lo tanto, una de las formas de bloquear esta secuencia fisiopatológica en sus primeras etapas sería el reforzamiento del sistema de defensas antioxidantes, con el fin de optimizar la depuración de los radicales libres que se asume aumentaría durante esta situación (Becker, 2004). 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 (Shiroshita-Takeshita *et al.*, 2005), ácido ascórbico (Korantzopoulos *et al.*, 2005), beta-bloqueadores (Andrews *et al.*, 1991) y ácidos grasos omega-3 (Jahangiri *et al.*, 2000), entre otros. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no han sido óptimos.

### **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 especies reactivas del oxígeno (ERO). Aunque recientemente se ha señalado que pueden intervenir múltiples factores

en el desarrollo de FAPO (Scherr *et al.*, 2006), las ERO 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 produciéndose 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-kB), lo cual a su vez activa la expresión de genes proinflamatorios (Cave *et al.*, 2005).

Una vez iniciado el proceso inflamatorio se produce la trans migración 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 exacerba 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 define como un desbalance entre la producción de especies reactivas al oxígeno (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 Glutación peroxidasa (GSH-Px) constituyen la primera línea de defensa contra las ERO, ya que inactivan a estas especies químicas. La CAT es una de las enzimas conocidas más eficientes, tanto que no puede ser saturada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a ninguna concentración, catalizando su conversión en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>. En animales, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se detoxifica mediante las actividades de la CAT y la GSH-Px. Aunque la CAT no es esencial para algunos tipos celulares en condiciones normales, como son por ejemplo las neuronas, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células (Cheeseman y Slater, 1993). La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido,

formando peróxido de hidrógeno, el cual a su vez puede ser destruido por las actividades de Catalasa o Glutación peroxidasa (Bilodeau y Hubel, 2003).

La GSH-Px comparte su sustrato con la CAT, pero además puede reaccionar en forma efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) usando glutación reducido, y así contribuye a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo (Cheeseman y Slater, 1993). En células animales y, especialmente en eritrocitos humanos, la principal enzima antioxidante para la detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es la GSH-Px, ya que la CAT presenta mucha menos afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rodrigo y Rivera, 2003).

Así, la actividad de estas enzimas y moléculas antioxidantes (tales como glutación, vitamina C y vitamina E) en el miocardio condiciona 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 glutación 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, generados por lipoperoxidación y carbonilación proteica principalmente y también a través de la actividad de enzimas antioxidantes como Superóxido dismutasa, Catalasa y Glutación peroxidasa (Reznick y Packer, 1994).

Las reacciones de lipoperoxidación consisten en un proceso de oxidación de los ácidos grasos polinsaturados (PUFA), propagándose de esta manera hasta la formación de tetróxidos que al ser inestables, generan aldehídos de bajo peso molecular (como por ejemplo el malondialdehído (MDA) que puede ser medido espectrofotométricamente) y cadenas hidrocarbonadas. Los aldehídos son moléculas muy reactivas y, por lo tanto, se desplazan sólo escasa distancia del sitio de su formación (Rodrigo y Rivera, 2003).

La peroxidación que afecta en forma especial a los fosfolípidos de la membrana plasmática, genera alteraciones de la fluidez, la estructura y función de canales, receptores y enzimas inmersas en ella (Shinitzky, 1984). Ésto ha sido asociado a

numerosas patologías, (Cooper, 1977) entre ellas la esclerosis sistémica. Al ser el MDA un producto de descomposición de la lipoperoxidación, se considera que se debe al estrés oxidativo (Var *et al.*, 2003). Se ha visto que la severidad de la preclampsia está correlacionada con la concentración de MDA en suero (Serdar *et al.*, 2002) y eritrocitos (Madazli *et al.*, 2002).

Se ha planteado que la depresión miocárdica producto del estrés oxidativo, tendría un papel importante en la actividad arritmogénica de los cardiomiocitos, aumentando la susceptibilidad para el desarrollo de FA (McMurchie *et al.*, 1999), probablemente debido alteraciones en la excitabilidad (Leifert *et al.*, 2000). La remodelación eléctrica juega un papel importante en la fisiopatología de la FA, observándose alteraciones en el manejo de iones como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , inducidas por la lipoperoxidación, (Korantzopoulos *et al.*, 2003, Schoonderwoerd *et al.*, 2005). Se piensa que la alteración de canales de  $\text{Na}^+$  ó  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependiente observada en la enfermedad de Alzheimer estaría mediada por el ataque de las ERO a la membrana plasmática (Ueda *et al.*, 1997) y que ésta se revertiría mediante el uso de vitaminas antioxidantes. Por otra parte, las alteraciones de los canales de  $\text{Na}^+$  tendrían efectos proarrítmicos (Fukuda *et al.*, 2005).

El ataque de las ERO a las proteínas se ejerce a través de modificaciones de determinados aminoácidos, formando grupos carbonilo por su oxidación (carbonilación). Como consecuencia, se altera la estructura primaria, secundaria y/o terciaria de las proteínas, cambia su carga eléctrica y se producen reacciones de unión cruzada formando productos de agregación.

El papel del estrés oxidativo en la FA aún no se ha precisado con toda claridad. Algunos investigadores han planteado que el incremento del 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, comparándola 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 radicales 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 (Mihm *et al.*, 2001; Korantzopoulos *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003). 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 (Mihm *et al.*, 2001; Korantzopoulos *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003). 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 caninos, 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 se acompañó de acortamiento del período refractario efectivo (PRE), 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, la depleción de glutatión, provocaría 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 ( $O_2^-$ ) fue 2,7 veces mayor en aurícula izquierda, en animales con FA, en relación a los controles. Estos investigadores concluyeron que el sistema NAD(P)H oxidasa tendría un rol prominente en la génesis de ERO durante FA, pues un inhibidor de esta enzima disminuyó en 91% la producción de anión superóxido en FA inducida en cerdos ( $O_2^-$ ) (Dudley *et al.*, 2005).

### **3. HIPÓTESIS**

En pacientes sometidos a cirugía de cardiopatías no congénitas, la suplementación previa con ácidos grasos omega-3 y vitaminas antioxidantes C y E, reduce la ocurrencia de fibrilación auricular postoperatoria (FAPO).

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la correlación entre el estado antioxidante/proxidante en el tejido auricular, sobre la base del análisis de biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante en eritrocitos, en un modelo de pre-acondicionamiento miocárdico no hipóxico.

### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar el estado antioxidante/proxidante y biomarcadores de estrés oxidativo en eritrocito.
2. Determinar el estado antioxidante/proxidante y biomarcadores de estrés oxidativo en tejido auricular.
3. Determinar la correlación entre el estado antioxidante/proxidante y biomarcadores de estrés oxidativo en ambos tipos celulares.
4. Aplicar el diseño metodológico propuesto en la predicción del desarrollo de FAPO.

### **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **6.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se realizó un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, placebo controlado. Los pacientes fueron seleccionados del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y del Hospital San Juan de Dios de un universo de 150, ambos sexos, promedio de edad 60, desde marzo 2008 hasta diciembre 2010. Los pacientes que van a ser sometidos a cirugía cardíaca, informados del estudio y que hayan firmado el consentimiento informado fueron distribuidos al azar, previa realización de electrocardiograma de reposo, a placebo o con una dosis diaria de 850 mg de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) en la razón de 1:2, respectivamente, desde 7 días previos a la cirugía programada. Dos días antes de la cirugía se agregó la suplementación de 500 mg de vitamina C cada 12 horas y 400 UI de vitamina E cada 24

horas. Estos 3 suplementos/placebos se administraron en forma ininterrumpida hasta el alta.

El protocolo de este estudio fue aprobado por los comités de bioética de ambos Hospitales y regida por la declaración de Helsinki (2001).

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

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 fueron:**

1. Fibrilación auricular crónica
2. Reoperación cardíaca
3. Ingesta de vitamina C o vitamina E un mes previo a 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

Esta etapa correspondiente al reclutamiento de los pacientes y la obtención de la muestra de tejido auricular fue realizada por los cardiólogos y cardiocirujanos de ambos hospitales. Los procedimientos bioquímicos posteriores, una vez obtenidas las muestras, fueron realizados en el Laboratorio de fisiopatología renal bajo mi análisis.

Tesis financiada por Proyecto Fondecyt: 1070948

## **6.2 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS**

Se tomaron muestras de sangre: previo a la incorporación de las vitaminas antioxidantes (día -2), al momento de la intervención quirúrgica (día 0) y postoperatoria temprana (antes de 12 horas). En el acto quirúrgico se extirpó un trozo 0,6-1g de tejido auricular (de orejuela derecha) conservado en nitrógeno líquido que fue almacenada a -80° C, para su posterior análisis bioquímico.

### 6.2.1 Pesquisa de fibrilación auricular postoperatoria

En el período postoperatorio, los pacientes se mantuvieron 3 días con monitorización electrocardiográfica continua, desde el cuarto día se realizó un registro electrocardiográfico diario y, en el caso de sintomatología sugerente de arritmia, hasta el alta. El día previo al alta se realizó un Holter de ritmo de 24 horas, que fue repetido al mes y a los 2 meses de seguimiento. Todos estos registros fueron analizados en forma ciega por 2 arritmólogos externos.

### 6.2.2 Determinación del estado antioxidante

A) **Relación glutatión reducido/glutatión oxidado:** Determinado en eritrocitos y tejido auricular por fluorimetría (Hissin y Hilf, 1976). Expresada como el valor absoluto del cociente de los valores de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) /g hemoglobina (Hb.) en eritrocito y relación/ g proteína (prot.) en tejido auricular.

El valor promedio de sujetos sanos se muestra en anexo **Tabla 1**.

B) Actividad de enzimas antioxidantes en eritrocitos y tejido auricular:

B1) **Catalasa (CAT):** se determinó por método espectrofotométrico siguiendo la cinética de descomposición del peróxido de hidrógeno a 240 nm y se calculó la constante cinética de primer orden para la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno (K) (Aebi, 1974). Expresada como K/ g Hb. en eritrocito y K/ g prot. en tejido auricular.

B2) **Superóxido dismutasa (SOD):** Se midió la cinética de activación de la autooxidación de catecoles tetracíclicos, por espectrofotometría a 525 nm. Expresada como U= 1 unidad de SOD se definió como la actividad que dobla la autooxidación de la adrenalina. (Misra y Fridovich ,1972). Expresada como U/ g Hb. en eritrocito y U/ g prot. en tejido auricular.

B3) **Glutatión peroxidasa (GSH-Px):** por técnica espectrofotométrica se midió la cinética de oxidación de NADPH acoplada a la reducción de GSSG a GSH, a 340 nm. Expresada como U = 1 unidad de GSH-Px se definió como la actividad que oxida 1  $\mu$  mol de NADPH por minuto (Flohé y Günzler, 1984). Expresada como U/ g Hb. en eritrocito y U/ g prot. en tejido auricular.

Los valores promedios enzimáticos de sujetos sanos se muestran en anexo **Tabla 1**.

### **6.2.3 Biomarcadores de estrés oxidativo**

Determinados en eritrocitos y tejido auricular:

A) **Lipoperoxidación:** Se determinó por la medición de Malondialdehído (MDA) mediante ensayo de reacción con ácido tiobarbitúrico (TBARS) por Cromatografía líquida de alta presión (Young y Trimble, 1991). Expresada como  $\mu$  moles de Malondialdehído/ g Hb. en eritrocito y  $\mu$  moles/ g prot. en tejido auricular.

B) **Carbonilación de proteínas:** El daño oxidativo de proteínas se determinó por método espectrofotométrico por ensayo de reacción con 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH), entre 350-390 nm (Reznick y Packer, 1994) Expresada como nmoles de Carbonilos/ g Hb. en eritrocito y  $\mu$  moles/ g prot. en tejido auricular.

Los valores promedio de biomarcadores de sujetos sanos se muestran en anexo **Tabla 1**.

## **6.3 MÉTODOS ESTADÍSTICOS**

### **6.3.1 Determinación de valores normales de estatus antioxidante y biomarcadores de estrés oxidativo.**

Fueron 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 fueron sometidos a cirugía cardíaca (n=50).

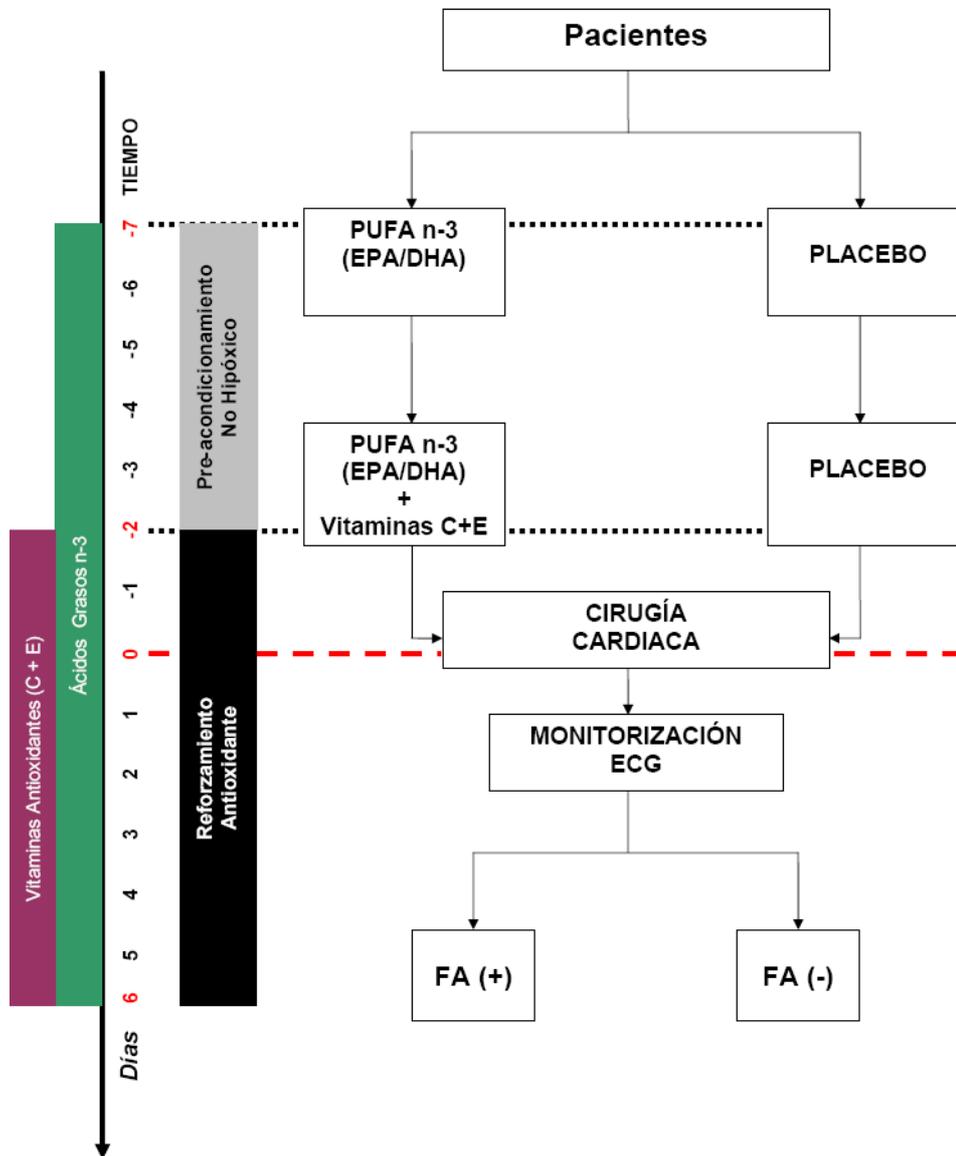
### **6.3.2 Cálculo del tamaño muestral.**

El tamaño muestral fue calculado sobre la base de una ocurrencia esperada de FAPO del 33,3% para el grupo control y 15,2% para el grupo con intervención terapéutica. Se calculó suponiendo un error  $\alpha$  del 5% con un poder de 80%, lo que determinó un tamaño muestral de 90 pacientes: 45 a Placebo y 45 a Suplemento (Win Episcopo 2.0).

### **6.3.3 Análisis estadístico.**

Los resultados obtenidos fueron expresados como promedios  $\pm$  desviación estándar y se compararon a través del test de Student para muestras no pareadas, tomando como significativa toda diferencia en que  $p \leq 0,05$ .

El estudio de correlaciones se realizó de acuerdo al test de Pearson o test de Spearman, dependiendo de si se obtiene o no una distribución normal, respectivamente. Los resultados fueron analizados mediante Programa Stata v8.0.



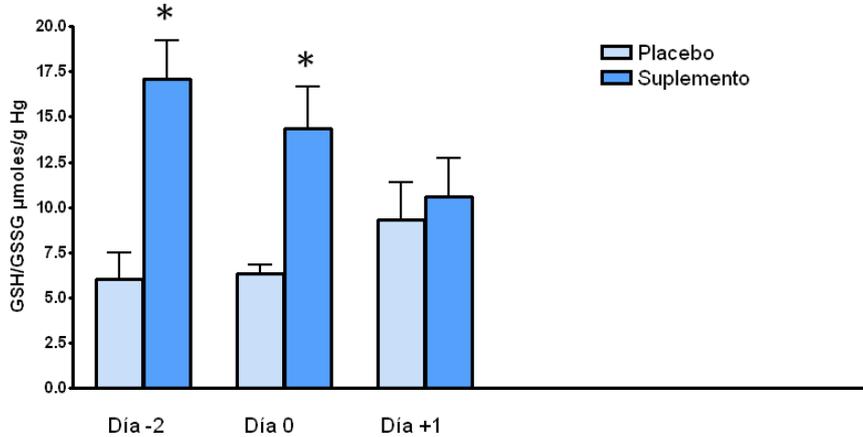
Esquema de la intervención para prevenir la fibrilación auricular postoperatoria

## 7. RESULTADOS

### I. Estado antioxidante en eritrocito

#### A) Relación glutatión reducido (GSH) /glutatión oxidado (GSSG):

Figura 1a. Glutatión reducido (GSH)/oxidado (GSSG) en eritrocito.



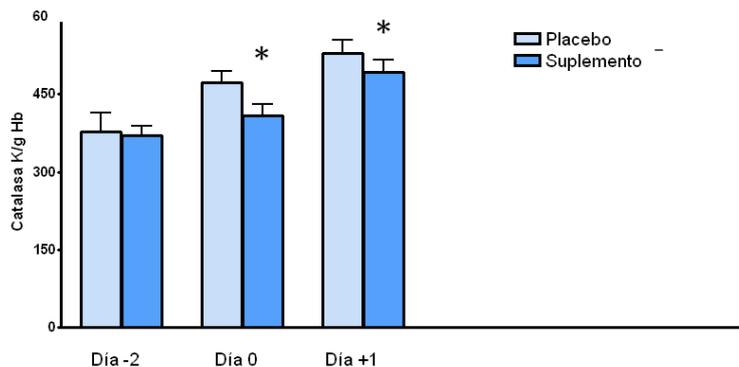
\* La diferencia fue estadísticamente significativa versus grupo placebo.  $p < 0.05$ . Hb: hemoglobina.

El grupo suplementado muestra niveles de relación GSH/GSSH en el día (-2) y el día operatorio (0) mayores en comparación del grupo placebo ( $6,04 \pm 1,43$  v/s  $17,12 \pm 2,07$ ;  $6,36 \pm 0,46$  v/s  $14,37 \pm 2,31$  respectivamente), siendo esta diferencia significativa. Aparece un aumento del 14% en el postoperatorio inmediato (+1) que no es significativo.

#### B) Actividad de enzimas antioxidantes:

##### B1) Catalasa (CAT):

Figura 1b. Actividad de Catalasa en eritrocito.



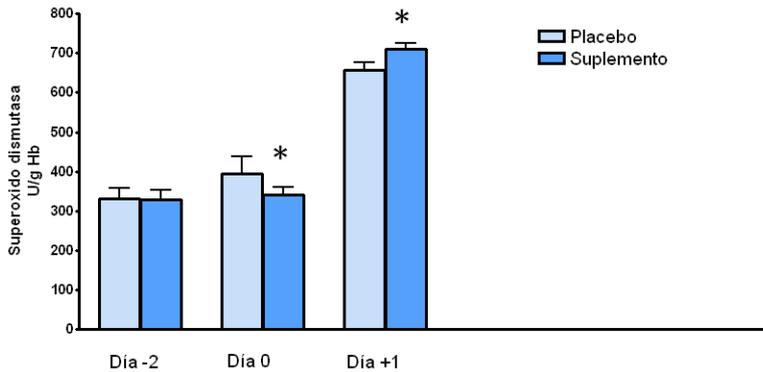
\* La diferencia fue estadísticamente significativa versus grupo placebo.  $p < 0.05$ . Hb: hemoglobina.

En el grupo suplementado la Catalasa presenta una actividad menor en comparación con el grupo placebo, siendo significativa esta diferencia en el día

operatorio (o) ( $471,88 \pm 21,79$  v/s  $408,16 \pm 22,29$ ) y en el día postoperatorio inmediato (+1) ( $528,60 \pm 25,43$  v/s  $493,16 \pm 23,71$ ).

**B2) Superóxido dismutasa (SOD):**

**Figura 1.2b. Actividad de Superóxido dismutasa en eritrocito.**

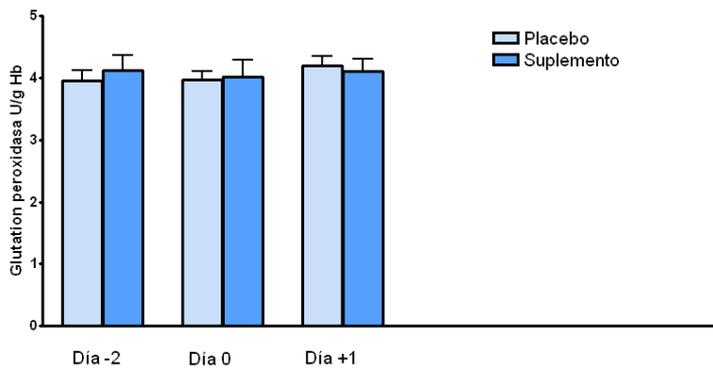


\* La diferencia fue estadísticamente significativa versus grupo placebo.  $p < 0.05$ . Hb: hemoglobina.

La SOD del grupo suplementado presenta una menor actividad en el operatorio (0) en un 13% siendo estadísticamente significativa en relación al grupo placebo ( $394,72 \pm 43,13$  v/s  $341,40 \pm 18,31$ ). En el postoperatorio temprano existe un incremento de un 8% en su actividad comparado con el grupo control siendo esta diferencia significativa ( $655,82 \pm 21,09$  v/s  $709,76 \pm 14,99$ ).

**B3) Glutación peroxidasa (GSH-Px):**

**Figura 1.b3. Actividad de Glutación peroxidasa en eritrocito.**



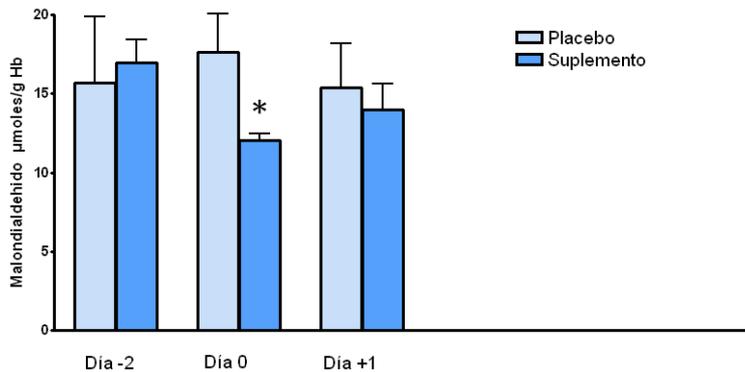
\* La diferencia fue estadísticamente significativa versus grupo placebo.  $p < 0.05$ . Hb: hemoglobina.

La actividad de la GSH-Px los días (-2), día de la cirugía (0) y postoperatorio inmediato (+1) no existe una diferencia significativa en relación al grupo placebo.

## II. Biomarcadores de estrés oxidativo en eritrocito

### A) Lipoperoxidación:

Figura 2a. Concentración de Malondialdehído en eritrocito.

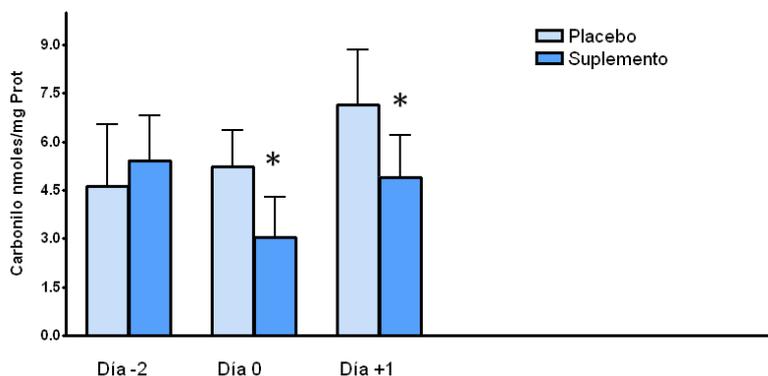


\* La diferencia fue estadísticamente significativa versus grupo placebo.  $p < 0.05$ . Hb: hemoglobina.

La lipoperoxidación manifestada por medio de los niveles de malondialdehído en eritrocitos evidencia una disminución tanto en el día operatorio como postoperatorio temprano de un 31 % ( $17,61 \pm 2,46$  v/s  $12,02 \pm 0,45$ ) y 9 % ( $15,4 \pm 2,76$  v/s  $13,98 \pm 1,66$ ) respectivamente siendo significativa tal diferencia el día operatorio frente al grupo placebo. En el día (-2) se evidencia un aumento 8% de este biomarcador del grupo suplementado en comparación con el grupo placebo, no siendo significativo.

B) **Carbonilación de proteínas:** Determinado en plasma, pues la interferencia de la hemoglobina del glóbulo rojo influye en la fluorescencia de la técnica para carbonilos.

Figura 2b. Concentración de Carbonilos en proteínas plasmáticas.



\* La diferencia fue estadísticamente significativa versus grupo placebo.  $p < 0.05$ . Prot: proteína.

La carbonilación de las proteínas plasmáticas evidencia una disminución tanto en el día operatorio como postoperatorio temprano de un 41 % ( $5,23 \pm 1,12$  v/s  $3,05 \pm 1,24$ ) y 31 % ( $7,15 \pm 1,70$  v/s  $4,91 \pm 1,31$ ) respectivamente siendo significativa tal

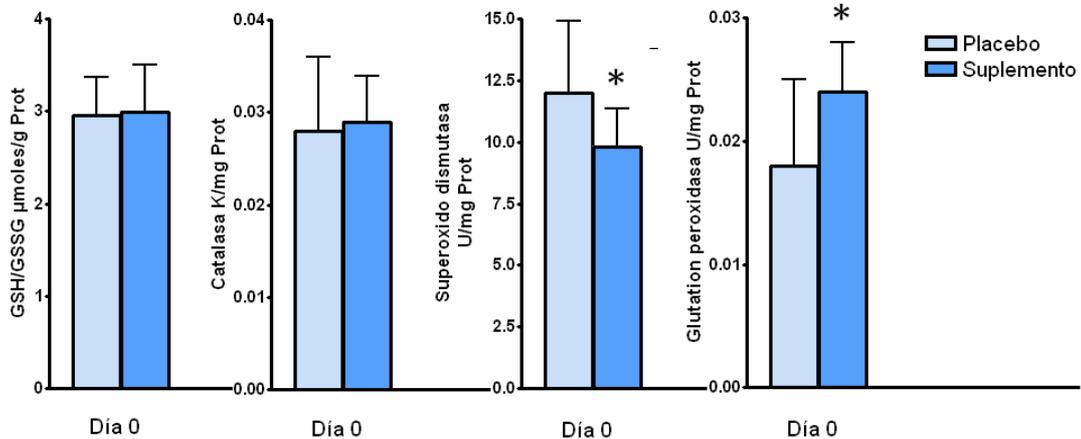
diferencia en ambos días frente al grupo placebo. En el día (-2) se evidencia un aumento 17 % de este biomarcador del grupo suplementado en comparación con el grupo placebo, diferencia no significativa.

### III. Estado antioxidante en tejido auricular

La determinación del estado antioxidante/proxidante en tejido auricular, junto con la correlación del mismo entre eritrocitos y tejido auricular fue calculado en base a un número muestral menor al propuesto, por inconvenientes clínicos, quirúrgicos y logísticos en la extracción de biopsia auricular al momento de la intervención quirúrgica. Se indica el tamaño muestral(N) para grupo suplementado (Ns) y grupo placebo (Np).

A) **Relación glutatión reducido (GSH) /glutatión oxidado (GSSG) y Actividad de enzimas antioxidantes (Ns=4, Np=4): Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD), Glutatión peroxidasa (GSH-Px).**

**Figura 3a. Relación glutatión y Actividad enzimática en tejido auricular.**



\* La diferencia fue estadísticamente significativa versus grupo placebo.  $p < 0.05$ . Prot: proteína.

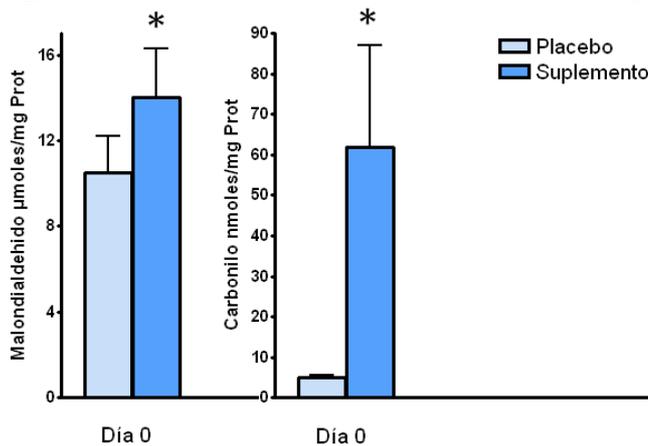
El grupo suplementado muestra niveles semejantes de relación GSH/GSSH en el día operatorio en comparación con el grupo placebo, sin existir diferencia significativa entre ambos grupos. La actividad de Catalasa en tejido auricular, no evidencia diferencia significativa entre el grupo suplementado y el grupo placebo el día de la cirugía. La SOD del grupo suplementado presenta una menor actividad en el día operatorio en un 18% ( $11,96 \pm 2,96$  v/s  $9,83 \pm 1,52$ ), siendo estadísticamente significativa en relación al grupo placebo. La actividad de la GSH-Px del grupo suplementado

muestra un aumento del 25% ( $0,018 \pm 0,007$  v/s  $0,024 \pm 0,004$ ) en relación al grupo placebo, siendo esta diferencia significativa en el día operatorio.

#### IV. Biomarcadores de estrés oxidativo en tejido auricular

##### A) Lipoperoxidación y Carbonilación de proteínas (Ns=4, Np=4):

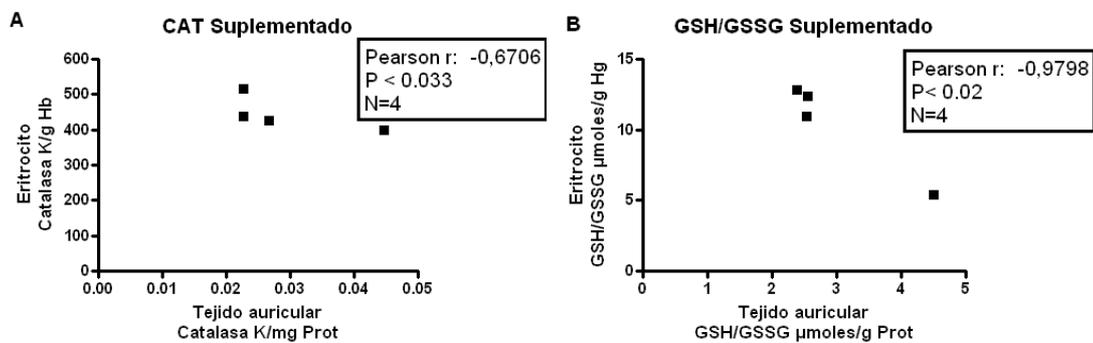
**Figura 4a. Biomarcadores de estrés oxidativo en tejido auricular.**



\* La diferencia fue estadísticamente significativa versus grupo placebo.  $p < 0.05$ . Prot: proteína.

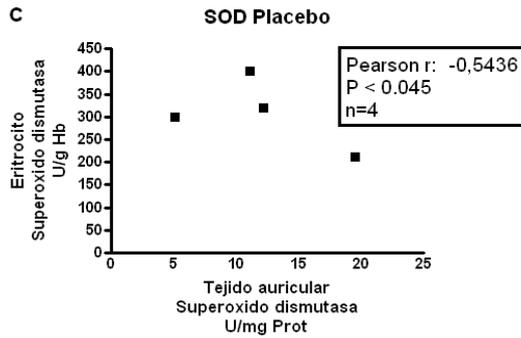
Los niveles de malondialdehído en el grupo suplementado aumentan en un 33,45% ( $10,52 \pm 1,67$  v/s  $14,04 \pm 2,26$ ) en relación al grupo placebo en el día operatorio, siendo tal diferencia estadísticamente significativa. La carbonilación de las proteínas en el grupo suplementado aumentan en un 92% ( $4,94 \pm 0,50$  v/s  $61,96 \pm 24,93$ ) en relación al grupo placebo en el día operatorio, siendo significativa tal diferencia.

#### Correlación entre el estado antioxidante eritrocitario v el estado antioxidante auricular: Catalasa (CAT) (A), Relación GSH/GSSG (B), Superóxido dismutasa (SOD) (C).



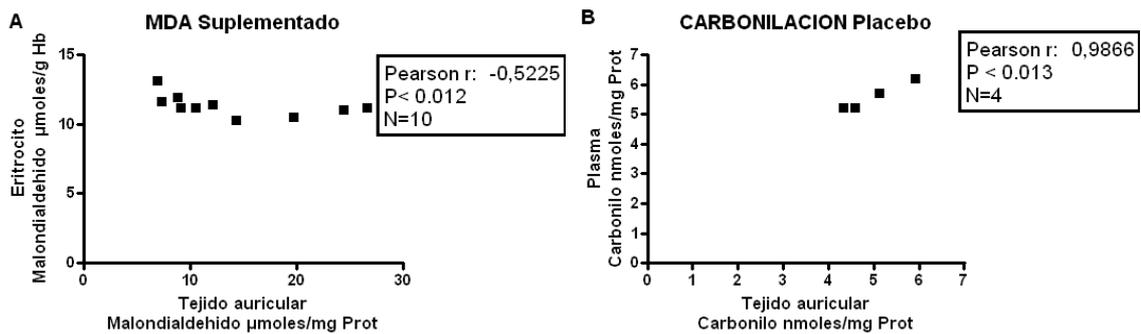
El grado de correlación para la actividad enzimática de Catalasa (CAT) se manifiesta en 0,67 negativo para el grupo suplementado evidenciado entre glóbulos rojos y tejido auricular. Para el estado de la relación GSH/GSSG en eritrocito, la

correlación es de 0,98 inversa para el grupo suplementado entre glóbulos rojos y tejido auricular.



En relación a la actividad de Superóxido dismutasa (SOD) se manifiesta en 0,54 inversa para el grupo placebo.

**Correlación de Biomarcadores de estrés oxidativo determinado entre eritrocitos y tejido auricular: Malondialdehido (MDA) (A), Carbonilación (B).**



El malondialdehido como biomarcador de estrés oxidativo presenta una correlación de 0,366 inversa para el grupo suplementado entre las determinaciones medidas en glóbulos rojos y tejido auricular. La carbonilación de proteínas presenta en el grupo placebo una alta correlación positiva de un 0,988 entre la determinación de carbonilos en glóbulos rojos y en tejido auricular

### **Predicción de fibrilación auricular postoperatoria bajo este diseño metodológico**

Los pacientes suplementado con omega-3 y vitaminas (C y E), según el protocolo ya planteado, han evidenciado un 9,8 % de FAPO en relación al grupo placebo que experimenta un 32%.Manifestando una reducción del riesgo relativo en un 68,5%. (Ver anexo **Figura 1** y **Tabla 3**).

Los pacientes que fueron suplementados, y de los cuales se evidencia la menor ocurrencia de FAPO, muestran valores del estado antioxidante/proxidante dentro del rango que presentan los pacientes tratados que tienen FAPO, existiendo solo diferencia significativa en una menor actividad enzimática de Catalasa y Superóxido dismutasa entre todas las medidas determinadas, siendo ese dato inverso al efecto que lograría la suplementación (Ver anexo **Tabla 2**).

## 8. DISCUSION

En este estudio se analizó un nuevo modelo de pre-acondicionamiento no hipóxico del miocardio, basado en el reforzamiento del sistema de defensa antioxidante contra el daño oxidativo consecutivo a la cirugía cardíaca con circulación extracorpórea (CEC). El estado antioxidante/proxidante del grupo placebo constituido por los mecanismos de defensa antioxidante extracelular (enzimas y vitaminas) e intracelular (glutación), no sería suficiente para contrarrestar el daño oxidativo, tanto a nivel eritrocitario como a nivel auricular, provocado por la cirugía.

Con respecto a la relación glutación (GSH reducido/GSSG oxidado) en eritrocitos, responsable de la defensa antioxidante intracelular, este experimenta un aumento significativo en el periodo analizado. Sin embargo, este indicador muestra en relación al grupo placebo una disminución lineal desde el día-2 al día +1 en los pacientes suplementados. Esta disminución podría explicarse por el consumo del glutación reducido debido al aumento de las ERO posterior a la reperfusión sanguínea en la cirugía cardíaca. Este comportamiento se asemeja al evidenciado en el trabajo de De Vecchi *et al.*, 1998 en donde un aumento de las ERO disminuyó los niveles de glutación reducido a nivel cardíaco.

El efecto de los omega-3 previo a la incorporación de las vitaminas (muestra día -2) se puede interpretar como la inducción de un estrés oxidativo “moderado”, capaz de despertar respuestas protectoras a nivel miocárdico durante el evento isquémico mayor. Lo anteriormente descrito se apoya en la relación de glutación (GSH/GSSG) el día -2 del grupo suplementado donde tal relación aumenta por predominio de glutación reducido frente al glutación oxidado.

Estudios realizados en diferentes tipos celulares o con diferentes fuentes de radicales libres describen que la inducción de estrés oxidativo en un breve lapso de tiempo aumenta la actividad de algunas enzimas antioxidantes, seguido de una rápida disminución en sus valores, incluso llegando a niveles basales (Dhalla *et al.*, 2000). En este estudio se evidencia un comportamiento algo contradictorio al expresado por Dhalla (2000), en donde la actividad de Catalasa eritrocitaria muestra una menor actividad en el grupo suplementado en el período analizado. No obstante, la SOD presenta un aumento de su actividad en el día +1 en el grupo suplementado reflejando

una respuesta antioxidante al incremento en la producción de ERO producidas por la reperusión del tejido al final de la CEC. La actividad de Glutación peroxidasa eritrocitaria se mantiene constante en el período testeado entre el grupo suplementado y el grupo placebo.

En el tejido auricular, la actividad enzimática de Catalasa y la relación glutación (GSH/GSSG) no muestran una diferencia significativa entre ambos grupos. Por el contrario la actividad enzimática de la SOD disminuyó en el día operatorio en el grupo suplementado, y la GSH-Px aumentó en el grupo suplementado, generando nuevamente un efecto contradictorio al experimentado por Dhalla *et al.*, 2000.

Los biomarcadores de estrés oxidativo (MDA y Carbonilación) obtenidos en la población placebo reflejan que la cirugía provoca un aumento en el estado prooxidante sistémico. Este estado prooxidante sistémico puede corroborarse fielmente por la alta correlación que existe entre la carbonilación proteica determinada en eritrocitos y la Carbonilación proteica en tejido auricular en el grupo placebo. Este efecto prooxidante concuerda con datos proporcionados por otros autores (Ochoa *et al.*, 2003, Ferreira *et al.*, 2003).

Ambos biomarcadores analizados en este estudio, se comportan de igual manera en el periodo testeado. El MDA eritrocitario disminuye significativamente en el grupo suplementado el día de la cirugía. En el caso de la carbonilación proteica medida en eritrocitos esa diferencia es significativa además en el día operatorio temprano. El comportamiento de estos biomarcadores evidencia el efecto de la suplementación administrada, mostrando un aumento de la defensa antioxidante frente al estrés oxidativo generado posterior a la reperusión cardiaca. Sin embargo, al inicio del período, es decir, solo con la suplementación de omega-3, se evidencia en ambos biomarcadores (MDA y carbonilación) un aumento no significativo con respecto al grupo placebo, más aun, dicho aumento es significativo y notablemente mayor en el tejido auricular el día operatorio en el grupo suplementado. Sugiriendo que tal comportamiento podría deberse al efecto acumulativo temporal del pre-acondicionamiento propuesto, junto a la estabilidad químicas de ambos biomarcadores testeados en este estudio, permaneciendo mayoritariamente en el tejido miocárdico.

En un ensayo clínico semejante realizado por Calò *et al.*, 2005, se administró a un grupo con placebo y a otro grupo con ácidos grasos omega-3 (EPA/DHA 2g/día) cinco días previos a la intervención quirúrgica programada de Bypass-coronario. Se evidenció en ese estudio que la administración de omega-3 durante la hospitalización en pacientes sometidos a intervención quirúrgica reduce la incidencia de Fibrilación auricular postoperatoria en un 54%, junto a una menor estadía hospitalaria de los pacientes intervenidos. Tal protocolo manifiesta al igual que este estudio, una reducción significativa de la FAPO al utilizar los ácidos grasos omega-3 como mecanismo preventivo de la fibrilación auricular posterior a la cirugía arterial de Bypass-coronario.

En resumen, los datos obtenidos demuestran la ocurrencia de estrés oxidativo en pacientes sometidos a cirugía cardíaca con CEC tanto a nivel del tejido auricular como a nivel sistémico, evidenciado en la alta correlación positiva de carbonilación como biomarcador en el grupo placebo. La suplementación con omega-3 y vitaminas antioxidantes atenuaría el daño oxidativo, logrando con la suplementación bajo este protocolo, una disminución de la ocurrencia relativa en un 68,5 % de la FAPO, junto con menor nivel de biomarcadores, sumado a un mayor nivel de relación glutatión (GSH/GSSG) y mayor respuesta al estrés oxidativo de CAT; SOD y GSH-Px. Representando todos estos datos una imagen del conjunto de mecanismos que intervienen la fisiopatología de la FAPO. Sin embargo, considerando que la fisiopatología de la misma depende no solo de la actividad enzimática, ni de las moléculas con actividad antioxidantes, no fue posible la determinación de un indicador del estatus antioxidante/proxidante que ponga en manifiesto bajo este diseño metodológico propuesto aquellos pacientes suplementados que podrán sufrir de FAPO posterior a una intervención quirúrgica cardíaca con CEC.

Entre las limitaciones del estudio cabe mencionar, la dificultad en la obtención de biopsias al momento de la cirugía, debido entre otros al excesivo tiempo quirúrgico, inconvenientes médicos de los pacientes, tipo de intervención quirúrgica (coronaria, valvular o mixta) o incoordinación en las medidas de traslado de las mismas desde el pabellón hospitalario al laboratorio de análisis.

## **9. CONCLUSION**

La suplementación con omega-3 y vitaminas antioxidantes atenúa el daño oxidativo en pacientes sometidos a cirugía cardíaca con CEC. Evidenciando en el grupo suplementado una mayor actividad enzimática, un aumento de la relación de glutatión, y menores índices de biomarcadores de estrés oxidativo.

En contraparte queda de manifiesto el papel que cumple el estrés oxidativo en la fisiopatología de la FAPO, en donde el estatus antioxidante/proxidante y biomarcadores de estrés oxidativo detectados muestran en el grupo placebo el efecto inverso a la suplementación.

Todo lo anteriormente dicho se resume en la menor proporción de FAPO que tienen los pacientes que pertenecen al grupo suplementado y al menor valor sistémico de indicadores del estrés oxidativo que sufre el grupo pre-acondicionado no hipóxico posterior a la intervención quirúrgica cardíaca con circulación extracorpórea.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Aebi, H. Catalase. In: *Methods in Enzymatic Analysis*. Bergmeyer H.U. (Ed.). 29th ed. Academic Press. New York, 1974.673-678.
- Andrews, T., Reimold, S., Berlin, J., Antman, E. Prevention of supraventricular arrhythmias after coronary artery bypass surgery. A meta-analysis of randomized control trials. *Circulation* 1991.84 (Suppl), 236-244.
- Becker, L.B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res*. 2004.61, 461-470.
- Bilodeau, J.F., Hubel, C.A. Current concepts in the use of antioxidants for the treatment of preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Can*, 2003. 25, 742-750.
- Calò, L., Bianconi, L., Colivicchi, F., Lamberti, F., Loricchio, ML., de Ruvo, E., Meo, A., Pandozi, C., Staibano, M., Santini M. N-3 Fatty acids for the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol*, 2005.45, 1723-1728.
- Carnes, C.A., Chung, M.K., Nakayama T. Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ Res*, 2001.89, 32-38.
- Cave, A.C., Grieve, D.J., Johar, S., Zhang, M., Shah, A.M. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. *Phil Trans Royal Soc*, 2005.360, 2327-2334.
- Cheeseman, K.H. y Slater, T.F. An introduction to free radical biochemistry. *Brit. Med. Bull*, 1993.49, 481-493.
- Cooper, R.A. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med*, 1977.297, 371-377.
- De Vecchi, E., Pala, M.G., Di Credico, G., Agape, V., Paolini, G., Bonini, P.A., Grossi, A., Paroni, R. Relation between left ventricular function and oxidative stress in patients undergoing bypass surgery. *Heart*, 1998.79, 242-247.
- Dhalla, N., Elmoselhi, A., Hata, T., Makino, N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2000.47, 446-56.
- Dudley, S.C., Hoch, N.E., McCann, L.A., Honeycutt, C., Diamandopoulos, L., Fukai, T., Harrison, D.G., Dikalov, S.I., Langberg, J. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation*, 2005.112, 1266-1273.

- Ferreira, R., Fraga, C., Carrasquedo, F., Hourquebie, H., Grana, D., Milei, J. Comparison between warm blood and crystalloid cardioplegia during open heart surgery. *Int J Cardiol*, 2003.90, 253-60.
- Flohé, L. y Günzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology*. S.P. Colowic and N.O. Kaplan (ed.). Academic Press, New York, 1984.105, 114-121.
- Fukuda, K., Davies, S.S., Nakajima, T., Ong, B.H., Kupersmidt, S., Fessel, J., Amarnath, V., Anderson, M.E., Boyden, P.A., Viswanathan, PC., Roberts, L.J., Balsler, J.R. Oxidative mediated lipid peroxidation recapitulates proarrhythmic effects on cardiac sodium channels. *Circ Res*, 2005.97, 1262-1269.
- Goette, A., Lendeckel, U. Nonchannel drug targets in atrial fibrillation. *Pharm Therap*, 2004. 102, 17-36.
- Grieve, D., Shah A. Oxidative stress in heart failure. *Eur Heart J*, 2003.24, 2161-2163.
- Hersi, A., Wyse, D. Management of atrial fibrillation *Curr Probl Cardiol*, 2005. 30, 175-233.
- Hissin, P.J. and Hilf, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 1976. 74, 214-226.
- Hogue, Ch., Hyder, M. Atrial fibrillation after cardiac operation: risks, mechanisms, and treatment. *Ann Thorac Surg* 2000.69, 300-306.
- Jahangiri, A., Leifert, W.R., Kind, K.L., McMurchie, E.J. Dietary fish oil alters cardiomyocyte Ca<sup>2+</sup> dynamics and antioxidant status. *Free Radic Biol Med*, 2006. 40, 1592-1602.
- Jahangiri, A., Leifert, W.R., Patten, G.S., McMurchie, E.J. Termination of asynchronous contractile activity in rat atrial myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Mol Cell Biochem*. 2000.206, 33-41.
- Kawano, S., Kubota, T., Monden, Y., Tsutsumi, T., Inoue, T., Kawamura, N., Tsutsui, H., Sunagawa, K. Blockade of NF-kappa B improves cardiac function and survival after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. 291,337-344.
- Kim, Y.H., Lim do, S., Lee, J.H., Shim, W.J., Ro, Y.M., Park, G.H., Becker, K.G., Cho-Chung, Y.S., Kim, M.K. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Exp Mol Med*, 2003.35, 336-49.

- Korantzopoulos, P., Kolettis, T., Siogas, K., Goudevenos, J. Atrial fibrillation and electrical remodeling: the potential role of inflammation and oxidative stress. *Med Sci Monit*, 2003.9, 225-229.
- Korantzopoulos, P., Kolettis, T.M., Kountouris, E., Dimitroula, V., Karanikis, P., Pappa, E., Siogas, K., Goudevenos, J.A. Oral vitamin C administration reduces early recurrence rates after electrical cardioversion of persistent atrial fibrillation and attenuates associated inflammation. *Int J Cardiol* 2005.102, 321-326.
- Leifert, W.R., Jahangiri, A., McMurchie, E.J. Membrane fluidity changes are associated with the antiarrhythmic effects of docosahexaenoic acid in adult rat cardiomyocytes. *J Nutr Biochem*, 2000.11, 38-44.
- Lévy, S., Sbragia, P. Remodelling in atrial fibrillation. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2005. 98, 308-312.
- Madazli, R., Benian, A., Aydin, S., Uzun, H., Tolun, N. The plasma and placental levels of malondialdehyde, glutathione and superoxide dismutase in pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol*, 2002. 22, 477-480.
- McMurchie, E.J., Leifert, W.R., and Head, R.J. Antiarrhythmic properties of n-3 fatty acids in cardiomyocytes: A role for membrane fluidity? In *Essential Fatty Acids and Eicosanoids*. Champaign, AOCS Press, 1999, 284-289.
- Mihm, M.J., Yu, F., Carnes, C.A. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation*, 2001. 104, 174-180.
- Misra H.P. y Fridovich I, The role of superoxide anion in the antioxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol Chem*, 1972. 247, 3170-3175.
- Ochoa, J., Vilchez, M., Mataix, J., Ibañez-Quiles, S., Palacios, M., Muñoz-Hoyos, A. Oxidative stress in patients undergoing cardiac surgery: comparative study of revascularization and valve replacement procedures. *J Surg Res*, 2003. 111, 248-254.
- Reznick, A.Z., Packer, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. In: *Methods Enzimol*, 1994. 233, 357-363.
- Roden, D.M. Human genomics and its impact on arrhythmias. *Trends Cardiovasc Med*, 2004. 14, 112-116.

- Rodrigo, R. y Rivera, G. Papel del estrés oxidativo y de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles (Monografía). Laboratorio de fisiopatología renal; programa de farmacología y clínica; Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile, 2003, 1-27.
- Scherr, K., Jensen, L., Smith, H., Kozak, CL. Atrial fibrillation following cardiac surgery: a retrospective cohort series. *Prog. Cardiovasc Nurs*, 2006. 21, 7-23.
- Schoonderwoerd, B.A., Van Gelder, I.C., Van Veldhuisen, D.J., Van den Berg, M.P., Crijns, H.J. Electrical and structural remodeling: role in the genesis and maintenance of atrial fibrillation. *Prog Cardiovasc Dis*, 2005.48, 153-168.
- Serdar, Z., Gur, E., Develioglu, O., Colakogullari, M., Dirican, M. Placental and decidual lipid peroxidation and antioxidant defenses in preeclampsia. *Lipid peroxidation in preeclampsia. Pathophysiology*. 2002. 9, 21-25.
- Shinitzky, M. Membrane fluidity and cellular functions. In: Shinitzky M, editor. *Physiology of membrane fluidity*. Boca Raton (FL). CRC Press, 1984. 1, 1-43.
- Shiomi, T., Tsutsui, H., Matsusaka, H. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation*, 2004. 109, 544-549.
- Shiroshita-Takeshita, A., Brundel, B.J., Nattel, S. Atrial fibrillation: basic mechanisms, remodeling and triggers. *J Interv Card Electrophysiol* 2005.13, 181-193.
- Thijssen, V., Ausma, J., Borgers, M. Structural remodeling during chronic atrial fibrillation: act of programmed cell survival. *Cardiovasc Res*, 2001. 52, 14-24.
- Ueda, K., Shinohara, S., Yagami, T., Asakura, K., Kawasaki, K. Amyloid beta protein potentiates  $Ca^{2+}$  influx through L-type voltage-sensitive  $Ca^{2+}$  channels: a possible involvement of free radicals. *J Neurochem*, 1997. 68, 265-271.
- Van Wagoner, D.R. Electrophysiological remodeling in human atrial fibrillation. *Pac Clin Electrophysiol*, 2003. 26, 1572-1575.
- Var, A., Kuscu, N.K., Koyuncu, F., Uyanik, B.S., Onur, E., Yildirim, Y., Oruc, S. Atherogenic profile in preeclampsia. *Arch. Gynecol. Obstet*, 2003.268, 45-47.
- Veenhuyzen, G.D., Simpson, C.S. Abdollah, H. Atrial fibrillation. *CMAJ*, 2004. 171: 755-760.

- Young, I.S. y Trimble, E. R. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Annals of Clinical Biochemistry*, 1991. 28, 504-508.

## ANEXO

**Tabla 1. Parámetros de estatus antioxidante/proxidante en sangre de 50 pacientes controles sin intervención.**

Estado Antioxidante	
Eritrocitos:	
Actividad de Catalasa (k/g Hb)*	283,5 ± 7,3
Actividad de Superóxido Dismutasa (U/g Hb)	454,6 ± 36,54
Actividad de Glutación Peroxidasa (U/g Hb)	5,84 ± 0,20
Relación GSH/GSSG**	5,81 ± 0,19
Biomarcadores de estrés oxidativo	
Plasma:	
Carbonilación proteica (nmoles/mg prot)	1,41 ± 0,44
Eritrocitos:	
Malondialdehido (μ moles/g Hb)	9,43 ± 0,12

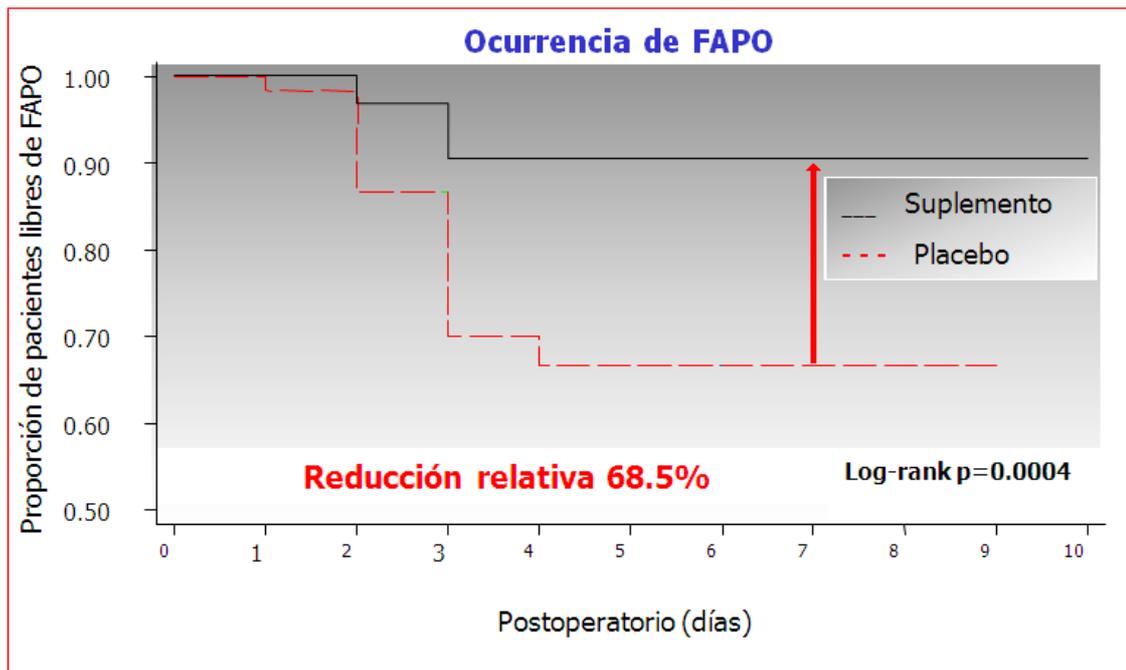
\* k, constante cinética de primer orden para la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno; Hb, hemoglobina; \*\*GSH, glutación reducido; GSSG, glutación oxidado.  
Los resultados están expresados en promedio ± EE para la población en estudio

**Tabla 2. Parámetros de estatus antioxidante/proxidante en pacientes suplementados con FAPO y grupo suplementado**

Estado Antioxidante		
	Suplementados c/FAPO	Suplementado
Eritrocitos:		
Actividad de Catalasa (k/g Hb)**	330,85±38,11	408,3±22,91*
Actividad de Superóxido Dismutasa (U/g Hb)	248,29±36,54	341,4±18,31*
Actividad de Glutación Peroxidasa (U/g Hb)	4,13±0,50	4,02 ± 0,27
Relación GSH/GSSG***	10,78±1,63	14,37 ± 2,31
Biomarcadores de estrés oxidativo		
Plasma:		
Carbonilación proteica (nmoles/mg prot)	sin dato	3,05±1.24
Eritrocitos:		
Malondialdehido (μ moles/g Hb)	11,67±0.03	12,08±0.53

\*\* k, constante cinética de primer orden para la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno; Hb, hemoglobina; \*\*\*GSH, glutación reducido; GSSG, glutación oxidado.\*La diferencia fue estadísticamente significativa: p<0.05.Los resultados están expresados en promedio ± EE para la población en estudio.

**Figura1. Ocurrencia de fibrilación auricular postoperatoria.**



**Tabla 3. Análisis de la eficacia del tratamiento en la población estudiada.**

<b>Análisis de eficacia</b>	
Incidencia de FAPO en suplementados	0.089
Incidencia de FAPO en placebo	0.306
Reducción riesgo absoluto	<b>0.217</b>
IC (95%)	0.13 - 0.64
Riesgo relativo	0.287
IC (95%)	0.117 - 0.706
Reducción riesgo relativo	<b>0.685</b>
IC (95%)	0.294 - 0.883
Número necesario a tratar (NNT)	<b>4.6</b>
IC (95%)	1.53 - 9.57
Valor p (Test de Fisher)	0.004