

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**



**PREVENCIÓN FARMACOLÓGICA DEL DAÑO  
MIOCÁRDICO POR REPERFUSIÓN EN INFARTO AGUDO  
DE MIOCARDIO**

**JAIME ALFREDO GONZÁLEZ MONTERO**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS Y  
ESPECIALIDAD EN MEDICINA INTERNA**

Directores de tesis:

**Dra. Gina Sanchez Vergara**

**Dr. Ramón Rodrigo Salinas**

**Dr. Juan Carlos Prieto Domínguez**

**2018**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO

## INFORME DE APROBACION TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas presentada por el candidato

### JAIME ALFREDO GONZÁLEZ MONTERO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Médicas y Especialidad en Medicina Interna** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 12 de Diciembre de 2018

---

Dra. Gina Sanchez Vergara

---

Dr. Ramón Rodrigo Salinas

---

Dr. Juan Carlos Prieto Domínguez

### COMISION INFORMANTE DE TESIS

---

DR. SERGIO LAVANDERO

---

DR. RODRIGO CORNEJO

---

DR. GABRIEL MALUENDA

---

DRA. PAULINA DONOSO  
Presidenta Comisión de Examen

*Dedicada a mis padres.*

*Elena y Jaime.*

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis fue financiada por:

- FONDECYT regular número **1120594** (Dr. Ramón Rodrigo)
- FONDECYT regular número **1130407** (Dra. Gina Sanchez)
- FONDEF **ID15I10285** (Dr. Ramón Rodrigo y Dra. Gina Sanchez)
- Programa de Doctorado en Ciencias Médicas y especialidad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Esta tesis se desarrolló en:

- Laboratorio de Estrés Oxidativo y Nefrotoxicidad (Dr. Ramón Rodrigo). Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- Laboratorio de Fisiopatología Cardíaca (Dra. Gina Sanchez). Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- Hospital San Juan de Dios.
- Hospital Clínico Universidad de Chile.
- Hospital Clínico San Borja Arriarán.

## PUBLICACIONES

1. Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities. **González-Montero J**, Brito R, Gajardo AIJ, Rodrigo R. *World J Cardiol* 2018; 10:74-86.
2. Antioxidants in human disease: Potential therapeutic opportunities. Rodrigo R, Brito R, **González-Montero J**, Benedetti V. *Clin Pharmacol Transl Med* 2017; 1: 44-53.
3. The effectiveness of antioxidant vitamins in reducing myocardial infarct size in patients subjected to percutaneous coronary angioplasty. Rodrigo R, **González-Montero J**, Parra P, Brito R. *Handbook of nutrition in heart health*. Pages 15-26. ISSN 2212-375X. Wageningen Academic Publishers 2017.
4. Effects of a novel ascorbate-based protocol on infarct size and ventricle function in acute myocardial infarction patients undergoing percutaneous coronary angioplasty. Ramos C, Brito R, **González-Montero J**, Valls N, Gormaz JG, Prieto JC, Aguayo R, Puentes Á, Noriega V, Pereira G, Palavecino T, Rodrigo R. *Arch Med Sci* 2017; 13:558-567.
5. Amelioration of persistent left ventricular function impairment through increased plasma ascorbate levels following myocardial infarction. Valls N, Gormaz J, Aguayo R, **González J**, Brito R, Hasson D, Libuy M, Ramos C, Carrasco R, Prieto JC, Dussailant G, Puentes Á, Noriega V, Rodrigo R. *Redox Report* 2016, 21: 75-83.

## PRESENTACIONES

2014

1. Heart function in patients with acute myocardial infarction treated with massive doses of ascorbate during percutaneous angioplasty. Gajardo A, Rodrigo R, Valls N, **González J**, Brito R, Gormaz J, Prieto J, Ramos C, Dussailant G, Aguayo R.

New Trends in Cardiovascular Drug Therapy: From bench to bedside. 30 May-1 June, 2014. Roma. Italia.

2. Relationship between antioxidant potential and left ventricular mass index following percutaneous angioplasty in patients with acute myocardial infarction treated with massive doses of ascorbate. Gajardo A, Rodrigo R, Valls N, **González J**, Brito R, Gormaz J, Prieto JC, Ramos C, Aguayo R, León L.

New Trends in Cardiovascular Drug Therapy: From bench to bedside. 30 May-1 June, 2014. Roma. Italia.

3. Estado redox de pacientes con infarto agudo de miocardio sometidos a angioplastía coronaria percutánea previa administración de dosis masivas de ascorbato. Brito R, Valls N, Libuy M, **González J**, Gormaz JG, Prieto JC, Aguayo R, Nes K, Ramos C, Leon L, Rodrigo R.

XXXVI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, 5-7 Noviembre, 2014, Chillán, Chile.

2015

4. The supplementation with high doses of ascorbate reduces the left ventricular function impairment following acute myocardial infarction. Cortés I, Valls N, Hasson D, Libuy M, Brito R, Contreras C, **González J**, Gormaz J, Rodrigo R.

BRAINCOMS Medical Congress. Brazilian International Congress of Medical Students. Sao Paulo, Brasil.

5. Efecto del ascorbato en la fracción de eyección de pacientes con infarto agudo de miocardio sometidos a angioplastía coronaria. Castillo G, **González J**, Brito R, Gormaz J, Sanchez G, Rodrigo R.

XXX Congreso Científico Internacional de la FELSOCCEM. Septiembre, Ciudad de Panamá, Panamá.

6. Prevención del daño miocárdico por reperfusión en infarto agudo de miocardio mediante la atenuación del estrés oxidativo. **González J**, Brito R, Castillo G, Gormaz JG, Valls N, Prieto JC, Aguayo R, Ramos C, Dussailant G, Puentes A, Rodrigo R.

XLVII Reunión Anual American College of Physicians Sociedad Médica de Santiago. Centro de Eventos Manquehue. Santiago, Chile.

2016

7. Efecto del ascorbato, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre el tamaño de infarto en un modelo murino de isquemia-reperfusión global en Langendorff. Castillo G, **González J**, Brito R, Gormaz J, Sanchez G, Rodrigo R.

XXXVIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Castro, Chile.

8. Prevention of reperfusion-induced cardiac injury in acute myocardial infarction through reduction of oxidative stress. **González J**, Brito R, Valls N, Gormaz JG, Prieto JC, Aguayo R, Ramos C, Rodrigo R.

ACP Internal Medicine Meeting. May 5-7, 2016. Walter E. Washington Convention Center. Washington DC, Estados Unidos.

9. Prevención del daño miocárdico por reperfusión en infarto agudo de miocardio mediante la atenuación del estrés oxidativo. **González J**, Brito R, Valls N, Gormaz JG, Prieto JC, Aguayo R, Ramos C, Rodrigo R.

Feria de Grados Académicos 2016. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

10. Efecto del ascorbato en el daño miocárdico por reperfusión en infarto agudo de miocardio: Relación entre obstrucción microvascular, función y remodelación ventricular. **González J**, Brito R, Ramos C, Aguayo R, Prieto JC, Gormaz JG, Rodrigo R.

Trigésimo cuarto Congreso Chileno de Medicina Intensiva (SOCHIMI), 2016. Coquimbo, Chile.

2017

11. Ascorbate, N-acetylcysteine and Deferoxamine improve ventricular function and myocardial infarct size in a murine model of global ischemia-reperfusion injury.

Castillo G, **González J**, Brito R, Gormaz J, Sanchez G, Rodrigo R.

ISCOMS 2017. 24th International Student Congress of (bio)Medical Sciences. Groningen, Holanda.

2018

12. Diseño de una solución de infusión de óptimo efecto cardioprotector en un modelo de corazón aislado de rata basada en la inhibición del estrés oxidativo.

Sanchez G, **González J**, Huechamil M, Chalmers S, Quezada M, Olmedo I, Gajardo A, Brito R, Aguayo R, Rodrigo R.

XXXIII Reunión Anual Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. Huilo Huilo, Chile.

13. Infarct size and ejection fraction determined by cardiac magnetic resonance: correlation with biomarkers of myocardial damage.

Del Valle-Batalla L, Castillo-Astorga R, **González J**, Rodrigo R.

BRAINCOMS Medical Congress. Brazilian International Congress of Medical Students. Sao Paulo, Brasil.

14. Efecto del ascorbato en la función y remodelación ventricular en pacientes con infarto agudo al miocardio sometidos a angioplastia coronaria percutánea.

Gothé MJ, Lizana P, Del Valle L, Prieto R, Bourgeois C, Ávila C, **González J**, Rodrigo R.

III Congreso Chileno de Estudiantes de Medicina (COCEM). Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

15. Obstrucción microvascular medida por resonancia nuclear magnética cardíaca: un marcador promisorio de daño miocárdico post infarto agudo de miocardio.

Valenzuela G, Giubergia F, Castillo R, Galdames M, Claps G, **González J**, Rodrigo R.

III Congreso Chileno de Estudiantes de Medicina (COCEM). Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.



16. Efecto del ascorbato en la prevención del daño miocárdico por reperfusión: Ensayo clínico aleatorizado multicéntrico. Rodrigo R, Aguayo R, Nes K, Puentes A, Noriega V, Gormaz JG, **González-Montero J**, Brito R, Gajardo A, Dussailant G, Ramos C, Prieto JC.

LV Congreso Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Sociedad Chilena de Cardiología (SOCHICAR) 2018. Concepción, Chile

## ÍNDICE

<b>Contenidos</b>	<b>Página</b>
<b>Índice de figuras</b>	12
<b>Índice de tablas</b>	13
<b>Resumen</b>	14
<b>Abstract</b>	16
<b>Introducción</b>	19
<b>Hipótesis</b>	27
<b>Objetivo general</b>	27
<b>Objetivos específicos</b>	27
<b>Metodología</b>	28
Etapa clínica	28
Etapa experimental	35
<b>Resultados</b>	39
Etapa clínica	39
Enrolamiento y características clínicas	39
Parámetros bioquímicos de daño miocárdico, estrés oxidativo y defensas antioxidantes	45
Tamaño de infarto y función ventricular	50
Reperusión angiográfica	53
Mortalidad	55
Etapa experimental	56
Curva dosis respuesta	56
Efectos cardioprotectores	58
<b>Discusión</b>	63
<b>Conclusión</b>	70

<b>Contenidos</b>	<b>Página</b>
<b>Referencias</b>	71
<b>Anexos</b>	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Contenidos</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Resumen del ensayo clínico aleatorizado multicéntrico.	33
Figura 2. Protocolo experimental en modelo murino de <i>Langendorff</i> .	38
Figura 3. Diagrama de flujo de los pacientes enrolados al ensayo clínico.	39
Figura 4. Concentración de ascorbato en sangre periférica en pacientes aleatorizados.	45
Figura 5. Capacidad antioxidante en sangre periférica en pacientes aleatorizados.	46
Figura 6. Lipoperoxidación en sangre periférica en pacientes aleatorizados.	47
Figura 7. Concentración de GSH en sangre periférica en pacientes aleatorizados.	48
Figura 8. Creatin kinasa isoenzima MB en sangre periférica post reperfusión entre grupos.	49
Figura 9. Variables morfológicas obtenidas en RNM precoz y tardía.	51
Figura 10. Variables funcionales obtenidas en RNM precoz y tardía.	53
Figura 11. TIMI myocardial perfusion grade entre grupos.	54
Figura 12. Mortalidad a dos años post IAM.	55
Figura 13. Curva dosis respuesta del efecto de ascorbato en tamaño de infarto.	56
Figura 14. Curva dosis respuesta del efecto de N-acetilcisteína en tamaño de infarto.	57
Figura 15. Curva dosis respuesta del efecto de deferoxamina en tamaño de infarto.	57
Figura 16. Efecto sobre tamaño de infarto de biasociaciones y triasociación.	58

<b>Contenidos</b>	<b>Página</b>
Figura 17. Efecto del tratamiento triasociado con AA-NAC-DFO en recuperación del desarrollo de presión ventricular.	60
Figura 18. Efecto del tratamiento triasociado con AA-NAC-DFO en recuperación de la presión de fin de diástole.	61
Figura 19. Contenido de GSH en tejido miocárdico en ratas sometidas a tratamiento triasociado con AA-NAC-DFO.	62

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Contenidos</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Características clínicas de los pacientes aleatorizados en ensayo clínico.	40
Tabla 2. Características de angioplastia coronaria percutánea realizada en los pacientes aleatorizados en el ensayo clínico.	41
Tabla 3. Características clínicas de pacientes aleatorizados que completaron el seguimiento con RNM precoz.	43
Tabla 4. Características clínicas de pacientes aleatorizados que completaron el seguimiento con RNM precoz y tardía.	44

## RESUMEN

### PREVENCIÓN FARMACOLÓGICA DEL DAÑO MIOCÁRDICO POR REPERFUSIÓN EN INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

**Introducción:** El infarto agudo de miocardio (IAM) es la primera causa de muerte en el mundo. Su terapia elección es la restauración del flujo coronario mediante angioplastia coronaria percutánea (ACP). Paradójicamente, la llegada súbita de oxígeno al tejido previamente isquémico y la movilización de hierro conlleva la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) generando daño miocárdico por reperfusión (DMR). Los antioxidantes como ácido ascórbico (AA) y N-acetilcisteína (NAC), y un quelante de hierro como deferoxamina (DFO) podrían prevenir el DMR. **Hipótesis:** La exposición a AA protege al miocardio contra el daño por reperfusión y su efecto es favorecido mediante la coadministración de DFO, protección que se ve potenciada con la adición de NAC. **Objetivo:** Prevenir el daño miocárdico que ocurre durante la reperfusión en IAM mediante la administración de AA en un ensayo clínico aleatorizado y su asociación con NAC-DFO en modelo murino de isquemia reperfusión miocárdica. **Metodología:** Se desarrolló un estudio clínico y experimental. En etapa clínica se administró AA por vía intravenosa a pacientes afectados con IAM con SDST sometidos a ACP. Se determinaron parámetros morfológicos y funcionales mediante resonancia nuclear magnética cardíaca (RNM) precoz (RNM1, 7-20 días post IAM) y tardía (RNM2, 3-4 meses post IAM), además de parámetros angiográficos, clínicos y bioquímicos de daño miocárdico. En etapa experimental se buscó optimizar el efecto cardioprotector del AA mediante la coadministración de NAC-DFO en modelo murino de *Langendorff*, determinándose parámetros morfológicos, funcionales y bioquímicos de daño miocárdico. **Resultados:** *Clínico:* Se enrolaron 105 pacientes (56 placebo, 49 AA). 67 (63,8%) y 44 (41,9%) pacientes completaron seguimiento con RNM1 y RNM2 respectivamente. No hubo diferencias en tamaño de infarto (TI) ni fracción de eyección. Hubo mayor número de pacientes tratados con AA que alcanzaron reperfusión angiográfica óptima. No hubo diferencias en

mortalidad a dos años post IAM. Hubo mayor lipoperoxidación y menor concentración de GSH post reperfusión en pacientes AA. *Experimental:* Se realizaron curvas dosis-respuesta según efecto de AA, NAC y DFO en TI, determinándose la concentración óptima donde se obtiene el mejor efecto cardioprotector: DFO 10  $\mu$ M, AA 100  $\mu$ M y NAC 100  $\mu$ M. Se observó disminución de TI con triasociación AA-NAC-DFO, lo que se asoció a mejoría de función ventricular y aumento en GSH en tejido miocárdico. **Discusión:** El tratamiento con ascorbato administrado durante la reperfusión miocárdica en pacientes con IAM sometidos a ACP muestra un resultado benéfico a nivel angiográfico, sin efectos en TI, y se asocia a mayor lipoperoxidación y descenso de GSH. La terapia de AA asociado a NAC-DFO durante la reperfusión miocárdica en modelo murino muestra optimización del efecto cardioprotector, mostrando un categórico beneficio morfológico, funcional y bioquímico. Los resultados de este estudio traslacional sientan las bases para el desarrollo de una terapia farmacológica racional con bajas dosis de tres fármacos de bajo costo y extendido uso en medicina humana para prevenir el DMR asociado al IAM.

**Palabras clave:** Daño miocárdico por reperfusión, ascorbato, N-acetilcisteína, deferoxamina.



## ABSTRACT

### PHARMACOLOGICAL PREVENTION OF MYOCARDIAL REPERFUSION INJURY IN ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

**Introduction:** Acute myocardial infarction (AMI) is the main cause of death worldwide. Therapy of choice is the restoration of coronary blood flow by percutaneous coronary angioplasty (PCA). Paradoxically, the sudden arrival of oxygen to the previously ischemic tissue and iron mobilization leads to a massive reactive oxygen species (ROS) production, generating myocardial reperfusion injury (MRI). Antioxidants such as ascorbic acid (AA) and N-acetylcysteine (NAC), and an iron chelator such as deferoxamine (DFO) could prevent MRI.

**Hypothesis:** Exposure to AA protects myocardium against MRI and its effect is favored by the simultaneous administration of DFO and NAC.

**Objective:** Prevent myocardial reperfusion injury in AMI patients by intravenous AA administration in a clinical trial, and its association with NAC-DFO in murine model of myocardial ischemia reperfusion.

**Methodology:** A two stage study was developed: clinical and experimental. *Clinical:* AA or placebo were administered intravenously to AMI patients treated with PCA prior to reperfusion. Morphological and functional ventricular parameters were determined by cardiac magnetic resonance imaging (CMR) early (CMR1, 7-20 days after AMI) and late (CMR2, 3-4 months after AMI). Angiographic, clinical and biochemical parameters of myocardial damage were also assessed. *Experimental:* In *Langendorff* ex-vivo murine model different AA, NAC and DFO concentrations were administered during myocardial reperfusion, to determine its effect at infarct size and to determine dose - response curves. It was administered an association of AA, NAC and DFO and were determined morphological, functional and biochemical effect at myocardium.

#### **Results:**

*Clinical:* 105 patients were enrolled (56 placebo, 49 AA). 67 (63.8%) and 44 (41.9%) patients completed follow-up with CMR1 and CMR2, respectively. There

were no differences in infarct size or ejection fraction. A greater number of patients treated with AA achieved optimal angiographic reperfusion. There were no differences in mortality at two years. There was greater lipid peroxidation and lower GSH concentrations in AA patients.

*Experimental:* Dose-response curves were performed according to the effect on infarct size, determining the concentration at which the best cardioprotective effect is obtained: DFO 10  $\mu$ M, AA 100  $\mu$ M and NAC 100  $\mu$ M. A major significant decrease in infarct size was observed with the association AA-NAC-DFO, which was associated with an improvement in systolic and diastolic function and increase in GSH in myocardial tissue.

**Discussion:** Intravenous treatment with AA prior to reperfusion in AMI patients subjected to PCA shows an improvement in angiographic reperfusion, without effects at infarct size. In murine model AA therapy associated with NAC and DFO during myocardial reperfusion shows an optimization of the cardioprotective effect of AA, demonstrating a categorical morphological, functional and biochemical benefit. This translational study provide the basis for the development of an associated pharmacological therapy with low doses of three drugs to prevent MRI in AMI patients.

**Key words:** Myocardial reperfusion injury, ascorbate, N-acetylcysteine, deferoxamine.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad cardiovascular y el infarto agudo al miocardio son la primera causa de muerte en Chile y el mundo [1-3]. El infarto agudo de miocardio con supradesnivel del segmento ST (IAM) se produce cuando existe isquemia profunda y prolongada en el tejido miocárdico producto de la oclusión de los vasos de la circulación coronaria, generando daño celular [4]. La rápida reperfusión para restaurar el flujo sanguíneo coronario es un imperativo en el tratamiento de estos pacientes [5]. En las últimas décadas ha habido una disminución significativa en las muertes por IAM debido a los avances en el diagnóstico y manejo de esta enfermedad [6], lo que ha sido posible principalmente gracias al desarrollo de la angioplastia coronaria percutánea (ACP) [7]. La ACP es el tratamiento de elección en el IAM [8, 9], logrando restaurar el flujo sanguíneo coronario significativamente en pacientes con IAM [10]. Paradójicamente la súbita restitución del flujo sanguíneo a la zona previamente sometida a isquemia se asocia a daño celular, en un fenómeno denominado daño miocárdico por reperfusión (DMR) [11-14]. El DMR se describió a principios del siglo pasado [15], pero no fue sino hasta hace pocos años que se sugirió por primera vez que la restauración del flujo sanguíneo coronario podría contribuir a daño miocárdico [16]. Clínicamente el DMR se ha asociado al desarrollo de reperfusión letal [12], arritmias por reperfusión [17], atontamiento miocárdico [18] y el fenómeno de *no-reflow* [19], lo que se asocia a mayor morbilidad y mortalidad post IAM [12].

### Rol del estrés oxidativo

El estrés oxidativo representa un mecanismo fisiopatológico unificador que se produce cuando hay un desequilibrio entre la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y los sistemas de defensa antioxidante en el organismo [20]. En este sentido, existen sistemas de defensa enzimáticos y no enzimáticos, entre los que se incluye el ascorbato (AA, o vitamina C), glutatión reducido, polifenoles y otros [21]. Los ROS son los principales mediadores de la lesión miocárdica producida por el DMR [13, 14]. Se ha demostrado fehacientemente que el súbito aumento de la oxigenación del tejido miocárdico después de la restauración del

flujo sanguíneo es seguido por un estallido de generación de ROS, tales como peróxido de hidrógeno, el radical superóxido y el radical hidroxilo [22]. Este incremento en la producción de ROS se debe - en gran parte - a la activación de NADPH oxidasa (NOX) en cardiomiocitos y células inflamatorias [23-25]. En esta línea, existe un aumento en la expresión de NOX en miocardio de rata [26] y humano [27] en IAM, y una atenuación del DMR tras su inhibición farmacológica [28]. Además, el knock-out de NOX disminuye hasta en un 50% el tamaño final del infarto [23], dando cuenta del papel crucial que juega esta enzima en el DMR. Otras fuentes de ROS en durante la reperfusión miocárdica y que dan cuenta del DMR son la activación de la xantina oxidasa [29, 30], la activación de la óxido nítrico sintasa [31], la mitocondria [32], entre otras.

### **Rol del hierro**

Se ha planteado la alteración en la homeostasis del hierro como un factor perjudicial para las células miocárdicas y que contribuiría al desarrollo del DMR [33, 34]. El hierro libre es tóxico para las células por lo que en el organismo el hierro está formando complejos con proteínas [35]. La importancia del hierro en el DMR radica en que puede amplificar la generación de ROS a partir de anión superóxido y peróxido de hidrógeno [36]. El papel desempeñado por los metales con actividad de oxidación-reducción en el daño oxidativo del miocardio está bien documentado [37, 38] existiendo una movilización precoz de hierro y cobre hacia la circulación coronaria luego de reperfusión miocárdica lo que amplifica la generación de ROS [33]. Tras la isquemia-reperfusión miocárdica existe movilización precoz de hierro desde las reservas intracelulares hacia el pool de hierro lábíl (LIP) en las zonas sometidas a este fenómeno, el que genera radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) [35], amplificando la producción de ROS y el daño celular asociado al DMR. La isquemia-reperfusión y el LIP estimulan además la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que lleva a una producción masiva de óxido nítrico (NO) [39] capaz de interactuar con el anión superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) - producido en grandes cantidades luego de la isquemia-reperfusión - para generar

peroxinitrito (ONOO•), otro radical libre de alta reactividad y responsable del estrés nitrosativo asociado al DMR [40].

Se ha demostrado ampliamente el efecto dañino del hierro en altas concentraciones a nivel miocárdico [41], y recientemente se han descrito propiedades cardioprotectoras de la terapia quelante de hierro [42]. La toxicidad cardíaca incluye insuficiencia cardíaca congestiva y arritmias, siendo la causa principal de muerte en pacientes con sobrecarga crónica de hierro [43]. La terapia quelante de hierro ha mejorado significativamente la supervivencia de estos pacientes [44], constituyéndose como una terapia segura y eficaz para el tratamiento de la sobrecarga de hierro [45].

Considerando todo lo anteriormente expuesto, es plausible plantear que la reperfusión miocárdica inducida por la ACP produce un estado de estrés oxidativo y nitrosativo, donde el aumento en la producción de ROS, determinado por la llegada súbita del oxígeno a la zona previamente isquémica, el aumento en la actividad de enzimas pro oxidantes y el movilización de hierro local, conduce a muerte celular [46], lo que contribuye a la generación de DMR [47].

### **Prevención del DMR**

Aunque el DMR tiene gran importancia clínica, en la actualidad es un problema no resuelto, y los intentos por solucionarlo han resultado infructuosos [11]. Durante décadas, la alta incidencia del DMR ha estimulado el desarrollo de múltiples estrategias farmacológicas destinadas a prevenir o reducir la mortalidad y la morbilidad asociada a este fenómeno [48]. Se han probado variadas intervenciones para prevenir el DMR, tales como fármacos que intervienen las vías intracelulares activadas en el cardiomiocito por la reperfusión (vías *RISK* y *SAFE*), o fármacos que impiden la conformación del poro de transición mitocondrial, fármacos antioxidantes, entre varias otras intervenciones, con resultados diversos, pero sin evidencia categórica de protección contra el DMR [47-49]. Se han llevado a cabo interesantes ensayos clínicos aleatorizados en este contexto con ciclosporina (estudio CIRCUS) [50], antioxidantes mitocondriales tales como TRO40303 (estudio MITOCARE) [51], con administración por vía intravenosa de

glucosa-insulina-potasio (estudio IMMEDIATE) [52] o eritropoyetina (estudio REVIVAL-3) [53], sin mostrar evidencia de protección contra el DMR. El preacondicionamiento isquémico remoto (RIPC) ha mostrado resultados prometedores [54-56], pero su efecto cardioprotector es difícil de ser llevado a la prevención del DMR en la práctica clínica. En el año 2017 Pasupathy et al. llevaron a cabo un interesante ensayo clínico donde se administró N-acetilcisteína (NAC) y un donador de NO administrado previo a la reperusión miocárdica en pacientes con IAM sometidos a ACP (estudio NACIAM [57]), en el que se demostró - por primera vez - una disminución del tamaño de infarto post IAM. Este importante estudio muestra por primera vez una intervención que disminuye el tamaño de infarto con una terapia coadyuvante a las terapias de reperusión, clarificando la importancia de las terapias antioxidantes para prevenir el DMR.

En base a los argumentos anteriormente expuestos, es plausible plantear que el uso de antioxidantes previo a la reperusión miocárdica podrían disminuir el DMR. La base de esta hipótesis es el alcanzar altas concentraciones plasmáticas de antioxidantes previo a la reperusión miocárdica. Así, para cuando el oxígeno llegue súbitamente a la zona previamente sometida a isquemia - que es el principal sustrato para la producción de ROS - los antioxidantes puedan reducir eficientemente estas moléculas y así prevenir el daño oxidativo y nitrosativo [58].

### *Ascorbato*

El ascorbato (AA) es un antioxidante esencial que tiene funciones en diferentes compartimentos celulares. El mecanismo más estudiado por el que el AA ejerce su actividad antioxidante es por su habilidad para reducir directamente a los ROS [59-61]. Además de su acción reductora, el AA ejerce una compleja modulación de numerosas enzimas involucradas en la producción de ROS, disfunción endotelial, agregación plaquetaria y regulación del tono del músculo liso vascular [62, 63]. Los mecanismos más importantes por los que el AA modula la función endotelial es a través del *down* regulation de la NOX, el up-regulation de eNOS, fosfolipasa A2 y las enzimas antioxidantes [64]. El AA puede directamente inhibir la expresión y función de la NOX, que es la principal fuente de anion

superóxido en el sistema cardiovascular [65, 66]. Se ha reportado que el AA podría estar involucrado en la modulación transcripcional de la NOX [67, 68]. Además el AA inhibe la expresión de la subunidad p47phox de la NOX, disminuyendo su actividad [69]. En presencia de estrés oxidativo, la eNOS está mayoritariamente en su forma desacoplada, lo que lleva a disfunción endotelial. En este contexto, se ha demostrado que el AA incrementa la actividad de eNOS porque previene la oxidación de la tetrahidrobiopterina [70]. Así el AA incrementa la síntesis de NO, reduce la formación de ROS y contribuye a la regulación del tono vascular [71-72].

El AA contrarresta y previene la oxidación de lípidos, proteínas y DNA, protegiendo su estructura y función biológica. Junto al glutatión, el AA constituye la primera línea de defensa contra los ROS [73]. La acción reductora del AA depende de su concentración, por lo que necesariamente requiere una administración por vía intravenosa para alcanzar concentraciones suficientes para prevenir el DMR asociado al IAM [58]. Esto es necesario porque la concentración plasmática de AA es finamente controlada, y un exceso de AA es excretado por vía renal. De hecho, cuando se administra AA por vía oral a las dosis las concentraciones plasmáticas de AA no superan los 250  $\mu\text{M}$ , concentración insuficiente para reducir efectivamente a los ROS. En contraste, la administración intravenosa de AA puede llevar de forma segura a concentraciones entre 25–30 mM [74]. Es interesante mencionar que la administración intravenosa de altas dosis de AA disminuye el daño endotelial asociado a ROS [75]. En esta línea, para bloquear la reacción del anión superóxido con el NO y la consecuente formación del ONOO• se necesitan concentraciones en el orden mM de AA en el plasma [76], niveles sólo alcanzables por vía intravenosa. Se ha documentado que la administración intravenosa de AA tiene un amplio rango de seguridad terapéutica en humanos [77, 78].

### *N-acetilcisteína*

Para ejercer su acción reductora, el AA consume glutatión reducido (GSH), por lo que el uso de altas dosis de AA podrían estar asociadas a una disminución en las reservas celulares de GSH [13]. Por esta razón la N-acetilcisteína (NAC), que es un precursor de la síntesis de GSH, podría tener un efecto favorecedor de

la acción antioxidante de las altas dosis de AA [58], repletando así las reservas que han sido depletadas por su uso en rutas detoxificadoras [79, 80], y además tiene una actividad antioxidante intrínseca [81]. La NAC ha sido utilizado en varios escenarios experimentales y clínicos por su actividad antioxidante. Se ha demostrado que la NAC administrado peri reperfusión miocárdica en pacientes con IAM se asocia a menor estrés oxidativo y preservación de la fracción de eyección ventrículo izquierdo post IAM [82-84]. Como fue anteriormente señalado, el estudio NACIAM de Pasupathy et al. [57] - recientemente publicado - demostró de forma fehaciente el rol cardioprotector del NAC en pacientes con IAM.

### *Deferoxamina*

Dado el importante rol de la movilización de hierro en el desarrollo del DMR, es plausible plantear que los quelantes de hierro podrían prevenir este daño [58]. Una de las drogas más utilizadas para este propósito es la deferoxamina (DFO). Los primeros reportes de uso para mejorar la función cardíaca en miocardio sobrecargado de hierro datan de hace tres décadas [85-87]. En modelos animales de isquemia reperfusión miocárdica se ha demostrado una disminución en tamaño de infarto y arritmias al utilizar DFO durante la reperfusión [88-90]. Paraskevaidis et al. sugirió que la infusión de DFO peri reperfusión miocárdica en pacientes con IAM puede reducir el atontamiento miocárdico luego de angioplastia electiva, lo que se asocia a mejoría en fracción de eyección [42]. Por último, en un estudio reciente Chan et al. aleatorizó pacientes con IAM para recibir DFO por vía intravenosa previo a la reperfusión miocárdica, demostrando una disminución en marcadores de lipoperoxidación, pero sin diferencias en tamaño de infarto [91].

Como se ha discutido previamente, existe evidencia clínica y experimental suficiente para sostener la visión de una nueva estrategia antioxidante combinada para prevenir el DMR en IAM. Aunque el AA es un conocido antioxidante, se ha documentado un efecto pro-oxidante asociados a su uso en condiciones específicas [92]. Esta paradoja del AA es explicable a través de dos hipótesis: su interacción con el LIP y el consumo de GSH. El hierro liberado durante la



reperfusión ( $\text{Fe}^{+3}$ ) puede oxidar al AA con una gran constante de velocidad, transformándolo en radical ascorbilo, produciendo  $\text{Fe}^{+2}$  que queda disponible para reaccionar con  $\text{O}_2^\bullet$  en la reacción de Fenton, en una retroalimentación positiva [93]. Además ocurre un consumo de GSH asociado a la acción antioxidante del AA, que es utilizado para la regeneración del radical ascorbilo [94]. Dado que el AA en altas dosis se puede asociar al desarrollo de estrés oxidativo por la depleción de GSH y su interacción con  $\text{Fe}^{+3}$ , es plausible plantear que su asociación con NAC (por su conocido rol de precursor de la síntesis de GSH) [95-97] y DFO (por su rol como quelante de hierro) [98, 99] pudiera optimizar su efecto cardioprotector.

### **Evaluación del DMR**

Un importante factor a tener en cuenta es la definición de un *outcome* primario adecuado para evaluar el DMR en pacientes con IAM. A la fecha, no existe un consenso en la forma de cuantificar el DMR [49]. Mientras algunos estudios determinaron un *outcome* clínico combinado de eventos adversos cardiovasculares mayores (o MACE, *major cardiovascular adverse events*), como en el estudio CIRCUS [50], otros miden el área bajo la curva en el gráfico concentración plasmática versus tiempo de los biomarcadores de daño miocárdico (troponina I o CKMB). Menos frecuentemente, algunos ensayos clínicos han medido fracción de eyección (FE), parámetros angiográficos como TMPG (*TIMI myocardial perfusion grade*) o cTFC (*corrected TIMI frame count*), o volúmenes ventriculares determinados por ecocardiografía o descenso del SDST en el electrocardiograma [49]. A pesar de esta diversidad en los estudios previos, la forma más validada para cuantificar el DMR luego de un IAM es la medición de tamaño de infarto miocárdico por resonancia nuclear magnética cardíaca (RNM), el que además permite el estudio de volúmenes y función ventriculares [100, 101]. Recientemente se ha descrito a la obstrucción microvascular (OMV) medida por RNM como un marcador precoz de disfunción ventricular [102], el que se correlaciona con morbilidad y mortalidad post IAM [103]

En base a estos antecedentes, es plausible plantear que el uso de AA previo a la reperfusión miocárdica podría reducir el DMR, y este efecto cardioprotector podría optimizarse con el uso concomitante de DFO y NAC.

## **HIPÓTESIS**

La exposición a ascorbato protege al miocardio contra el daño por reperfusión y su efecto es favorecido mediante la coadministración de deferoxamina, protección que se ve potenciada con la adición de N-acetilcisteína

## **OBJETIVO GENERAL**

Prevenir el daño miocárdico que ocurre durante la reperfusión en infarto agudo de miocardio mediante la administración de AA en un ensayo clínico aleatorizado y su asociación con NAC y DFO en un modelo murino de isquemia reperfusión miocárdica.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

En pacientes con IAM con SDST sometidos a ACP luego de la administración intravenosa de AA o placebo:

- Determinar parámetros bioquímicos de daño miocárdico, estrés oxidativo y defensas antioxidantes en sangre periférica.
- Determinar tamaño de infarto y función ventricular precoz y tardía mediante RNM.
- Determinar parámetros angiográficos de reperfusión miocárdica
- Determinar mortalidad post IAM

En un modelo de *Langendorff* luego de la administración de distintas combinaciones y concentraciones de AA, NAC y DFO durante la reperfusión:

- Cuantificar tamaño de infarto y parámetros funcionales miocárdicos
- Determinar concentración de GSH en tejido miocárdico

## **METODOLOGÍA**

Para poner a prueba el efecto protector de los antioxidantes en el DMR, estos experimentos se desarrollaron en dos etapas: una clínica y una experimental. En la etapa clínica se llevó a cabo un ensayo clínico aleatorizado multicéntrico y controlado por placebo, donde se administró AA o placebo por vía intravenosa y previo a la reperfusión miocárdica a pacientes con IAM sometidos a ACP, tras lo cual se determinaron parámetros clínicos, angiográficos y morfológicos y funcionales miocárdicos mediante resonancia nuclear magnética cardíaca (RNM) precoz (7-20 días post IAM, RNM1) y tardía (3-4 meses post IAM, RNM2), además de biomarcadores de daño oxidativo y miocárdico en sangre periférica. En la etapa experimental se buscó optimizar el efecto protector del AA mediante la coadministración de DFO y NAC en un modelo murino de *Langendorff* [104], donde se midieron parámetros bioquímicos, morfológicos y funcionales de daño miocárdico.

### **Etapa clínica**

Se realizó un ensayo clínico aleatorizado multicéntrico, doble ciego, controlado por placebo. El estudio se llevó a cabo en:

- Hospital Clínico Universidad de Chile
- Hospital San Juan de Dios
- Hospital Clínico San Borja-Arriarán

El protocolo incluyó pacientes con diagnóstico de IAM con SDST mayores de 18 años, sin historia previa de IAM, que ingresaron a dichos centros a realizarse ACP de urgencia. El ensayo clínico fue inscrito en el registro ISRCTN, con el código ISRCTN56034553.

### *Criterios de inclusión*

- Pacientes de ambos sexos, mayores de 18 años
- Con IAM con SDST, con indicación clínica de ACP de urgencia, dada por: angina o equivalente anginoso de al menos 20 minutos de duración, con electrocardiograma que muestre SDST que comprometa al menos 2

derivaciones contiguas (mayor a 2 mm), presentación de los síntomas hace menos de 12 horas, sin antecedente de episodios anteriores de IAM, y con capacidad física e intelectual para entender y firmar el consentimiento informado.

#### *Criterios de exclusión*

- Antecedente de insuficiencia hepática o renal
- Antecedente de litiasis renal por oxalatos
- Antecedente de insuficiencia cardíaca (capacidad funcional III ó IV)
- Edema pulmonar agudo (Killip III) o shock cardiogénico (Killip IV) al momento de realización de procedimiento.
- Cualquier comorbilidad seria que determine una esperanza de vida menor a 6 meses
- Participación en otro protocolo de investigación clínica
- Embarazo
- Deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

#### *Aleatorización*

Luego de la firma del consentimiento informado y del diagnóstico electrocardiográfico, se registraron las características demográficas, comorbilidades y farmacoterapia previa de cada paciente. Todos los pacientes incluidos fueron aleatoriamente asignados a uno de los dos siguientes grupos:

- Grupo suplementado: Que recibió una solución de ascorbato de sodio por vía intravenosa (56 g de dosis total). El fármaco se administró en una solución de 1000 mL que se infundió a un ritmo de 15 mL/min hasta la deflación del balón de angioplastía, y luego a 5 mL/min hasta que se completó un litro de solución en total.
- Grupo placebo: Que recibió una solución de igual volumen y osmolaridad que la administrada al grupo suplementado, constituida por cloruro de sodio.

Luego de la evaluación inicial, los pacientes incluidos en el estudio ingresaron al pabellón de Hemodinamia de los tres centros anteriormente mencionados. De acuerdo al protocolo estándar del tratamiento de reperfusión en IAM, se realizó una angiografía para identificar la arteria responsable del infarto. Se registró la localización y extensión del IAM (número de arterias involucradas), flujo TIMI inicial y final, y vía de abordaje (femoral o radial). Se tomó consentimiento informado a todos los pacientes ingresados al empezar el protocolo (**Anexo 1**)

### *Muestreo*

Se tomaron cuatro muestras de sangre periférica de vena cubital, en cuatro distintos momentos del protocolo (**Figura 1**):

- Muestra 1 (M1): Al momento del enrolamiento (previo a la administración de la solución).
- Muestra 2 (M2): Inmediatamente después de la deflación del balón de angioplastia (reperfusión).
- Muestra 3 (M3): A las 6-8 horas luego de la ACP.
- Muestra 4 (M4): Al momento del alta hospitalaria.

Las muestras fueron recolectadas en *vacutainers* que contienen EDTA-disódico y centrifugadas a 3000 g por 10 minutos para separar el plasma de los elementos figurados. Los glóbulos rojos fueron sometidos a hemólisis hipotónica por dilución con agua destilada. Se guardó el plasma y los lisados de glóbulos rojos a -80°C hasta realizar los análisis bioquímicos.

### *Medición de parámetros morfofuncionales miocárdicos*

Se evaluó el tamaño del infarto y función ventricular mediante RNM [105] tomada en dos ocasiones:

- Precoz: Tomada a los 7-20 días post IAM (RNM1)
- Tardía: Tomada a los 3-4 meses post IAM (RNM2)

Este examen se realizó en el Departamento de Radiología del Hospital Clínico Universidad de Chile, Clínica Alemana o Clínica Red Salud Santiago

(Bicentenario) y fue analizado por tres médicos Radiólogos especialistas en Radiología de Tórax, ciegos a información clínica, del Departamento de Radiología del Hospital Clínico Universidad de Chile.

Cada RNM consistió en:

- RNM-cine, para evaluación de volúmenes ventriculares (volumen de fin de sístole y de fin de diástole), masa ventricular y función ventricular (medición de fracción de eyección)
- RNM-DE, para medición del tamaño del infarto

Las mediciones también contemplaron la cavidad ventricular en una secuencia cine sin supuestos geométricos, y con alta resolución espacial, para permitir una estimación fidedigna de la fracción de eyección ventricular. Las especificaciones del equipo de RNM son: Modelo Siemens Sonata 1,5 tesla, Coil: 4 channel array coil, Software: syngo PSIR sequence available.

Para la medición de tamaño de infarto (*outcome* primario del estudio), cada Radiólogo le asignó un puntaje de forma independiente, y luego se promediaron las tres mediciones para obtener el valor final. Se determinó el índice *Kappa de Fleiss* para determinar la concordancia entre las tres mediciones [106]. Para la determinación de función y volúmenes ventriculares, la medición se realizó por un Radiólogo especialista en Imagenología de Tórax, ciego a información clínica.

#### *Medición de parámetros bioquímicos de daño miocárdico y estrés oxidativo*

En las cuatro muestras sanguíneas tomadas de los pacientes (M1-4), se realizaron mediciones de parámetros de estrés oxidativo, poder antioxidante y de daño miocárdico:

- F2-isoprostanos en plasma sanguíneo [107]
- GSH en sangre periférica [108]
- Capacidad total antioxidante en plasma sanguíneo (*Ferric reducing ability of plasma*, FRAP) [109]
- Concentración plasmática de AA [110]
- Creatin kinasa isoenzima MB (CK-MB)

### *Medición de parámetros angiográficos de daño miocárdico*

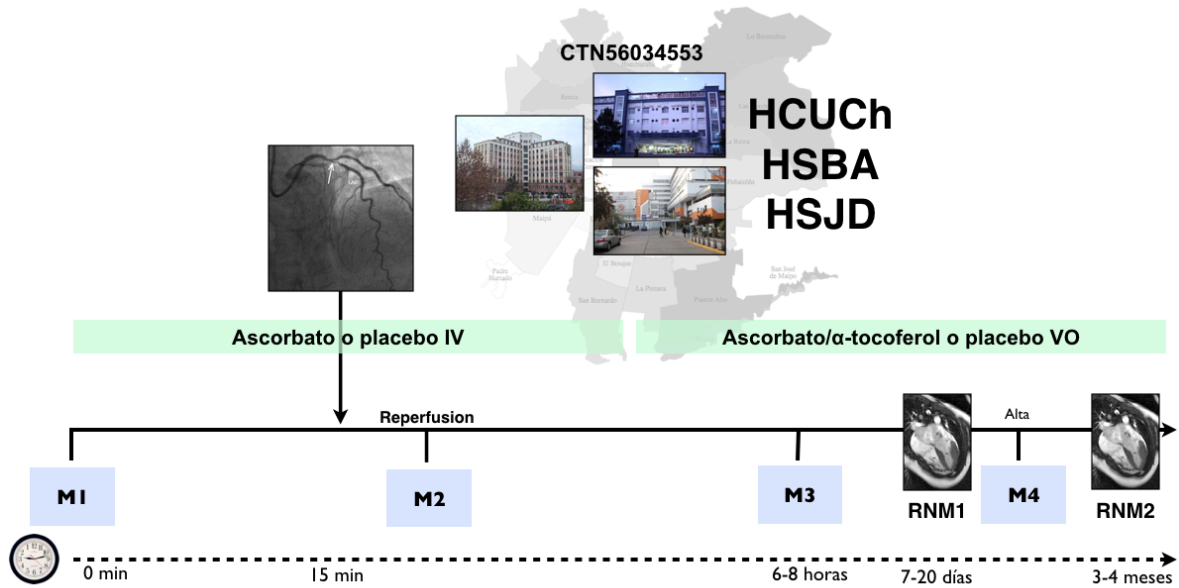
Para el análisis de parámetros angiográficos de daño miocárdico, cada registro en video de la angioplastia realizada fue evaluado por dos médicos Cardiólogos Intervencionales (Hemodinamistas) de manera conjunta, ciegos a información clínica. Se determinó el *TIMI myocardial perfusion grade* (TMPG), asignándose de manera consensuada un puntaje de 0 (reperusión deficiente) a 3 (reperusión óptima) a cada paciente. El TMPG es un marcador de perfusión miocárdica luego de ACP, que predice morbilidad y mortalidad post IAM [111]. Se determinó además de manera conjunta y consensuada el *TIMI frame count* (cTFC, conteo de cuadros) que es un marcador angiográfico cuantitativo de reperusión miocárdica determinada por angiografía [112].

### *Outcomes clínicos*

En los pacientes enrolados en el estudio se determinó la mortalidad a dos años post IAM mediante entrevista telefónica y mediante búsqueda de fecha de mortalidad en datos del Registro Civil de Chile. La supervivencia post IAM se expresó mediante gráfico de Kaplan Meier.

Se determinaron los eventos cardiovasculares mayores post IAM (*major adverse cardiovascular events*, MACE) dentro de dos años post IAM, mediante la aplicación de una encuesta telefónica al paciente o a un familiar de primer grado, donde se preguntó retrospectivamente por eventos cardiovasculares. Se definió como MACE a la muerte por cualquier causa, nuevo IAM, necesidad de revascularización miocárdica y síntomas de insuficiencia cardíaca. A cada evento determinado por encuesta telefónica se le asignó un punto. La encuesta y posterior asignación de MACE fue aplicada por un observador ciego a información clínica.





**Figura 1. Resumen del ensayo clínico aleatorizado multicéntrico.** La flecha indica el momento de la reperusión, lograda a través de la angioplastia coronaria percutánea. HCUCh: Hospital Clínico Universidad de Chile. HSBA: Hospital Clínico San Borja Arriarán. HSJD: Hospital San Juan de Dios. RNM1: Resonancia nuclear magnética cardíaca precoz (realizada a los 7-20 días post IAM). RNM2: Resonancia nuclear magnética cardíaca realizada tardía (realizada a los 3-4 meses post IAM). IV: Intravenoso. VO: Vía oral. M1: Muestra 1, tomada al momento del enrolamiento (previo a la administración de la solución). M2: Muestra 2, tomada inmediatamente después de la deflación del balón de angioplastia (reperusión). M3: Muestra 3, tomada a las 6-8 horas luego de la ACP. M4: Muestra 4, tomada al momento del alta hospitalaria.

### *Análisis estadístico de etapa clínica*

Los resultados de variables continuas fueron expresados como promedio  $\pm$  error estándar. La comparación entre variables paramétricas se realizó utilizando Student's T-test. Las variables no paramétricas se expresaron como promedio y se compararon con Mann-Whitney U-test. Las diferencias entre grupos (grupos placebo versus AA) fue determinada a través de análisis de varianza (ANOVA) con test post-hoc de Tukey, para variables paramétricas, y por test de Kruskal-Wallis con test post-hoc de Dunn, para variables no paramétricas. Se consideró como estadísticamente significativo un p menor a 0,05.

Las correlaciones entre parámetros funcionales y bioquímicos fueron establecidas a través de test de Pearson o Spearman, de acuerdo a la distribución de las variables. Los resultados fueron analizados usando Stata versión 12,0, Microsoft Excel y GraphPad Prism 7,0.

El *outcome primario* para este estudio fue la medición de tamaño de infarto mediante RNM1. Considerando que hasta un 50% del tamaño final de infarto puede deberse a la reperfusión [11-14], se consideró una disminución de 28% en tamaño del infarto como mínima eficacia de intervención [29]. Con una potencia del 80% y un error tipo 1 del 0,05, se calculó un universo de 43 pacientes por grupo (AA y placebo).

### *Consentimiento informado y ética*

Una vez pesquisado el paciente, se le solicitó consentimiento informado para ingresar al estudio (**Anexo 1**). Se contó con la autorización del Comité de Ética del Hospital Clínico Universidad de Chile, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y del Servicio de Salud Metropolitano Central para la realización del estudio (**Anexo 2**)

## Etapa experimental

Para evaluar el efecto cardioprotector de los antioxidantes sobre el daño producido por isquemia reperfusión se utilizaron corazones aislados de rata perfundidos por el sistema de *Langendorff* [104]. El sistema de *Langendorff* es un método ampliamente utilizado para la comprensión de la fisiología cardíaca y destaca por su aplicación en el entendimiento de la fisiopatología de la isquemia reperfusión coronaria. Se comparó el efecto de la perfusión miocárdica con una solución con AA, NAC y/o DFO en dosis crecientes, versus una solución inactiva. Ambas suplementaciones fueron administradas durante la reperfusión (**Figura 2**). Se cuidaron las condiciones de almacenamiento y exposición lumínica de las soluciones, para procurar mantener su estabilidad.

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dowley de 250-300 gramos de peso, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina y de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Las ratas se anestesiaron vía intraperitoneal con pentobarbital 50 mg/kg de peso. Luego de realizarse la exéresis cardíaca y tras ser canulados por la aorta, los corazones fueron perfundidos con una solución tampón-bicarbonato Krebs-Henseleit modificada (en mM: NaCl 128; NaHCO<sub>3</sub> 20,2; KCl 4,7; NaHPO<sub>4</sub> 0,4; MgSO<sub>4</sub> 1,1; CaCl<sub>2</sub> 1,35; 11 C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) a flujo constante (12-14 mL/min), a temperatura constante (37°C) y burbujeada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>.

Luego de 20 minutos de perfusión con dicha solución (período de estabilización), se realizó la isquemia miocárdica global deteniendo perfusión con la solución, manteniendo la monitorización eléctrica y mecánica del corazón. Luego de 30 minutos de isquemia, se realizó la reperfusión por 50 minutos y un lavado con solución de Krebs por 10 minutos.

Se ajustó la osmolaridad de la solución inactiva (solución de Krebs-Henseleit) agregando agregando NaCl 10% para obtener una osmolaridad idéntica a la de la solución activa, y las soluciones fueron perfundidas a flujo constante (12-14 mL/min), a temperatura constante (37°C) y burbujeada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>.

Los registros de los parámetros contráctiles se realizaron en todos los corazones. Se excluyeron los corazones que durante el período de estabilización:

- No lograron un desarrollo de presión (PDVI) igual o superior a 60 mmHg
- No lograron una presión de perfusión mayor a 60 mmHg
- Aquellos en los que el tiempo exéresis-ensamblaje al sistema de perfusión fue mayor a 2 minutos (para evitar preconditionamiento isquémico).

#### *Medición de parámetros morfológicos y funcionales*

Para medir la presión de perfusión se conectó al sistema de perfusión un transductor de presión y éste a uno de los canales del Powerlab®. Para medir la presión del ventrículo izquierdo se introdujo un balón de látex conectado a un segundo transductor de presión y se infló hasta obtener una presión de 5-10 mmHg, fijándose así la presión diastólica final del ventrículo izquierdo. Con los datos del transductor de presión intraventricular se registra el cambio de presión, a través del cual se calcula: desarrollo de presión del ventrículo izquierdo (PDVI), presión de fin de diástole (PFD) y frecuencia cardíaca, con el fin de conocer la actividad contráctil miocárdica durante todo el protocolo.

Al final del experimento, los corazones se perfundieron con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 1% en solución Krebs-Henseleit a 37°C por 10 minutos, para medición de tamaño de infarto. Después de 30 minutos a 4°C, los corazones se cortaron en 5-6 rebanadas en forma perpendicular al eje mayor. Los trozos fueron escaneados digitalmente y se calculó el volumen de tejido viable (zonas teñidas) y de necrosis (zonas no teñidas) usando ImageJ®. Con el volumen total (tejido necrosado versus tejido total) se calculó el porcentaje de tejido miocárdico infarto.

#### *Medición de glutatión en tejido miocárdico*

Al finalizar el protocolo, en la mitad de los experimentos realizados (corazones en los que no se midió tamaño de infarto con TTC) se descolgó el

corazón del sistema de perfusión y se congeló con nitrógeno líquido para realizar molienda con mortero. El material resultante fue congelado a -80°C. Se determinar

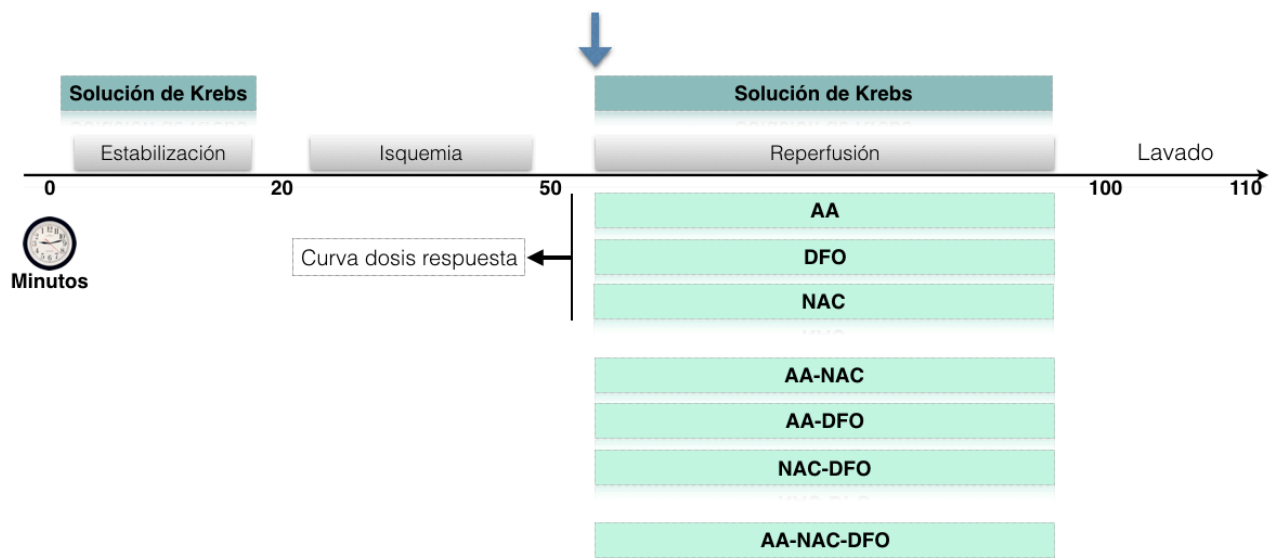
- Niveles de glutatión total en tejido miocárdico mediante método de Griffith [113]
- Residuos de nitrotirosina en tejido miocárdico [114] mediante *western blot*.
- Lipoperoxidación en tejido miocárdico mediante la determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS, *thiobarbituric acid reactive substances*) mediante kit de medición por espectrofotométrico (*TBARS assay kit, Cayman Chemicals*).

#### *Análisis estadístico en etapa experimental*

Los parámetros contráctiles se expresaron como porcentaje del valor obtenido justo antes de iniciar la isquemia (basal), a excepción de la presión de fin de diástole, que se expresó como valores absolutos (ambos como promedios  $\pm$  DS). Para comparar dos grupos se utilizó Student's t-test o Mann-Whitney U-test, según la distribución paramétrica o no paramétrica de las variables, respectivamente. Se consideró significativo un p menor a 0,05. Se utilizó un número mínimo de 5 animales por cada protocolo de experimentación.

#### *Bioética*

Se contó con la autorización y supervisión del Comité de Ética de estudios en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile para la realización de estos experimentos (**Anexo 3**).



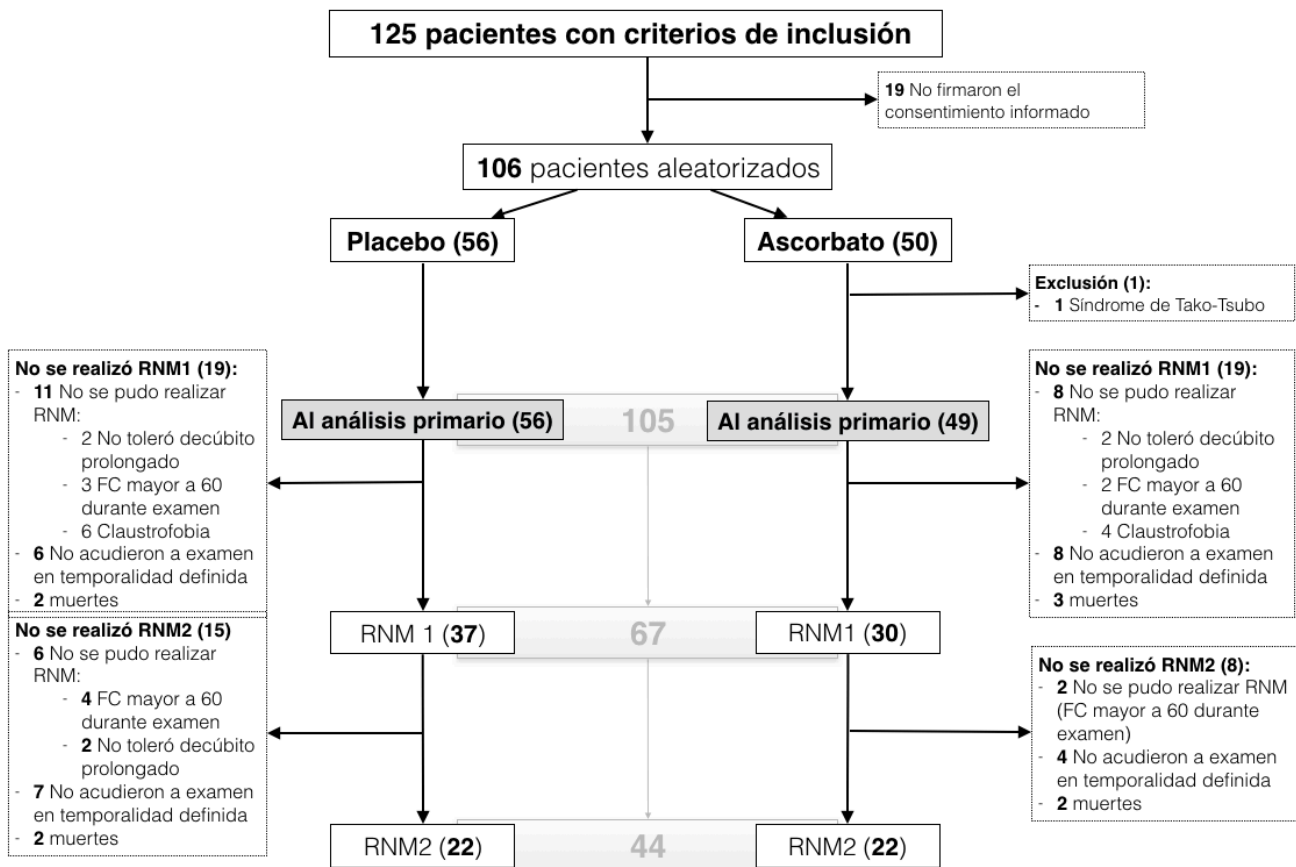
**Figura 2. Protocolo experimental en modelo murino de *Langendorff*.** AA: Ascorbato. DFO: Deferoxamina. NAC: N-acetilcisteína. Se realizó una estabilización de 20 minutos con perfusión con solución de Krebs. Luego se realizó una isquemia global de 30 minutos de duración, para continuar con una reperusión de 50 minutos (y posteriormente 10 minutos de lavado con solución de Krebs), con distintas soluciones. Se perfundieron corazones con solución de Krebs (inactiva), con monoterapia con AA, DFO o NAC (para obtener curva dosis respuesta), con biasociaciones de AA-NAC, AA-DFO y NAC-DFO, y con la triasociación de AA-NAC-DFO. La flecha indica el momento de la administración de la solución activa durante la reperusión.

## RESULTADOS

### Etapa clínica

#### 1. Enrolamiento y características clínicas

125 pacientes cumplieron criterios de inclusión en los tres centros antes mencionados. El detalle del flujo de pacientes se muestra en **Figura 3**.



**Figura 3. Diagrama de flujo de los pacientes enrolados al ensayo clínico.** 106 pacientes recibieron la infusión con ascorbato o placebo. 1 paciente fue excluido post aleatorización. Se muestran las razones por las que no se realizó RNM1 y/o RNM2 en cada grupo. Las RNM fueron realizadas mayoritariamente en el Departamento de Radiología del Hospital Clínico Universidad de Chile (103). Dos RNM fueron realizadas en Clínica Alemana de Santiago y una RNM fue realizada en Clínica Redsalud Santiago. Los pacientes fueron trasladados en ambulancia de mediana complejidad desde su centro de hospitalización al centro donde se realiza RNM (ambulancias Génesis y ambulancias Montano).

En la **Tabla 1** se muestran las características clínicas, signos vitales, tratamiento farmacológico previo y antecedentes mórbidos de los 105 pacientes enrolados en el estudio.

	Placebo	Ascorbato	Total	P value
Número de pacientes totales (%)	56 (53,3%)	49 (46,6%)	105 (100%)	-
Realización de RNM1: n (%)	37 (66,1%)	30 (61,2%)	67 (63,8%)	0,6061
Realización de RNM2: n (%)	22 (39,2%)	22 (44,9%)	44 (41,9%)	0,5609
Edad promedio: años	55,6 ± 10,1	58,4 ± 11,3	56,8 ± 10,68	0,2301
Sexo masculino: n (%)	48 (85,7%)	34 (69,3%)	82 (78,1%)	0,0436*
Presión sistólica al ingreso: mmHg	155,0 ± 15,6	144,6 ± 24,1	147,0 ± 22,3	0,4350
Presión diastólica al ingreso: mmHg	89,7 ± 12,5	89,0 ± 10,9	89,2 ± 10,8	0,9178
Frecuencia cardíaca: latidos por minuto	94,5 ± 2,1	80,1 ± 17,8	79,6 ± 18,28	0,5121
IMC: kg/m <sup>2</sup>	28,4 ± 4,4	27,1 ± 4,4	27,8 ± 4,4	0,2922
Mortalidad a dos años: n (%)	4 (7,14%)	5 (10,20%)	9 (8,57%)	0,5762
	<b>Comorbilidades</b>			
HTA: n (%)	21 (37,5%)	23 (46,9%)	44 (41,9%)	0,3281
DM-2: n (%)	11 (19,6%)	8 (16,3%)	19 (18,1%)	0,6597
Tabaquismo: n (%)	30 (53,5%)	23 (46,9%)	53 (50,4%)	0,4977
Dislipidemia: n (%)	16 (28,5%)	11 (22,4%)	27 (25,7%)	0,4739
	<b>Tratamiento farmacológico previo</b>			
IECA y/o ARA-2: n (%)	14 (25,0%)	13 (26,5%)	27 (25,7%)	0,8579
Acido acetilsalicílico: n (%)	9 (16,1%)	11 (22,4%)	20 (19,0%)	0,4064
Bloqueadores beta-adrenérgicos: n (%)	2 (3,5%)	6 (12,2%)	8 (7,6%)	0,0947
Estatinas o fibratos: n (%)	6 (10,7%)	6 (12,2%)	12 (11,4%)	0,8057
Diuréticos: n (%)	1 (1,7%)	4 (8,2%)	5 (4,8%)	0,1078
Bloqueadores de canales de calcio: n (%)	1 (1,7%)	1 (2,0%)	2 (1,9%)	0,8881
Inhibidores del receptor de aldosterona: n (%)	2 (3,5%)	2 (4,1%)	4 (3,8%)	0,8407

**Tabla 1. Características clínicas de los pacientes aleatorizados en ensayo clínico.** IMC: Índice de masa corporal. HTA: Hipertensión arterial. DM-2: Diabetes mellitus tipo 2. IECA: Inhibidores de enzima convertidor de angiotensina. ARA-2: Antagonistas del receptor de angiotensina 2. Tabaquismo se definió como consumo de cualquier cantidad de cigarrillos previo al infarto agudo de miocardio. Comparaciones entre grupos se realizaron por Chi-cuadrado para variables categóricas, y Student's T-test para variables continuas según corresponda, con GraphPad Prism 7,0. Los valores corresponden numero absoluto de pacientes y porcentajes.



En la **Tabla 2** se muestra un resumen de las características de los procedimientos de ACP de todos los pacientes enrolados en el estudio en los tres centros.

	Placebo	Ascorbato	Total	P value
<b>Número de pacientes totales</b>	<b>56</b>	<b>49</b>	<b>105</b>	<b>-</b>
<b>Centro de enrolamiento</b>				
Hospital San Juan de Dios: n (%)	49 (87,5%)	39 (79,5%)	88 (83,8%)	0,2724
Hospital Clínico San Borja Arriarán: n (%)	3 (5,3%)	6 (12,2%)	9 (8,5%)	0,2085
Hospital Clínico Universidad de Chile: n (%)	4 (7,1%)	4 (8,1%)	8 (7,6%)	0,8441
<b>Arteria comprometida</b>				
Arteria descendente anterior: n (%)	29 (51,7%)	24 (48,9%)	53 (50,4%)	0,5918
Arteria coronaria derecha: n (%)	22 (39,2%)	14 (28,5%)	36 (34,2%)	0,2485
Arteria circunfleja: n (%)	5 (8,9%)	11 (22,4%)	16 (15,2%)	0,0645
<b>Vía de abordaje de angioplastia coronaria percutánea</b>				
Arteria radial: n (%)	55 (98,2%)	46 (93,8%)	101 (96,2%)	0,2468
Arteria femoral: n (%)	1 (1,8%)	3 (6,2%)	4 (3,8%)	
<b>Tipo de stent (BMS o DES)</b>				
DES: n (%)	15 (26,7%)	12 (24,4%)	27 (25,7%)	0,7883
BMS: n (%)	41 (73,3%)	37 (75,6%)	78 (74,3%)	
<b>Flujo TIMI inicial</b>				
0-1: n (%)	54 (96,4%)	48 (97,9%)	102 (97,1%)	0,6386
2-3: n (%)	2 (3,6%)	1 (2,1%)	3 (2,9%)	
<b>Flujo TIMI final</b>				
0-1: n (%)	4 (7,1%)	1 (2,0%)	5 (4,7%)	0,2207
2-3: n (%)	52 (92,9%)	48 (98,0%)	100 (95,3%)	

**Tabla 2. Características de angioplastia coronaria percutánea realizada en los pacientes aleatorizados en el ensayo clínico.** DES: Drug-eluting stents. BMS: Bare metal stent. Análisis estadístico se realizó con tabla de contingencia y análisis con Chi-cuadrado, con el software GraphPad Prism 7,0. Análisis estadístico para detectar diferencias entre grupos se realizó por Chi-cuadrado. Los valores corresponden numero absoluto de pacientes y porcentajes.

### *Resonancia nuclear magnética cardíaca*

La RNM es un examen de alta complejidad, de aproximadamente una hora de duración, que se realiza dentro de una cámara aislada y oscura, que requiere que el paciente tolere el decúbito supino por cerca de una hora y además mantenga una frecuencia cardíaca cercana a 60 latidos por minuto, esto para su adecuada interpretación en todas las fases del ciclo cardíaco. En este ensayo clínico implicó además la logística del traslado de los pacientes en ambulancia desde el centro de enrolamiento hasta el centro donde se realiza el examen. Tomando estos puntos en consideración, se realizaron en total 111 RNM (67 RNM1 y 44 RNM2). 108 de ellas fueron realizadas en el Departamento de Radiología del Hospital Clínico Universidad de Chile, mientras que 2 fueron realizados en Clínica Alemana de Santiago y 1 en Clínica Red Salud Santiago (ex Clínica Bicentenario). Todos los exámenes se llevaron a cabo con equipos de similares características, e interpretados de manera central con el mismo software y por el mismo equipo médico. En la **Figura 3** se muestran las razones por las que no se completó RNM1 y/o RNM2 en algunos de los pacientes enrolados.

En 67 pacientes se realizó RNM1 (63,8% de los pacientes enrolados), población que se caracteriza en la **Tabla 3**. No hubo diferencias significativas en características clínicas de pacientes sometidos a RNM1. En 44 pacientes se completó el seguimiento con dos RNM (41,9% de los pacientes enrolados), población que se caracteriza en la **Tabla 4**. No se encontraron diferencias significativas en características clínicas de pacientes en los que se realizó RNM2. La tasa de realización de RNM está acorde a los trabajos previamente publicados que utilizan RNM para estudio de complicaciones post IAM [57], pérdida de pacientes derivada de la complejidad de la realización de este examen. Cabe destacar además la alta prevalencia de claustrofobia en la población estudiada (n=10, 9,52% de pacientes enrolados), lo que limitó sustancialmente la realización de RNM.

	Placebo	Ascorbato	Total	P value
Número de pacientes	37	30	67	0,6061
Edad promedio: años	55,3 ± 9,3	57,1 ± 12,0	56,1 ± 10,5	0,4912
Sexo masculino: n (%)	34 (91,9%)	23 (76,7%)	82 (85,1%)	0,0820
IMC: kg/m <sup>2</sup>	28,5 ± 4,5	27,1 ± 4,4	27,9 ± 4,4	0,2914
Tiempo IAM-RNM1: días	16,9 ± 9,4	15,4 ± 11,1	16,2 ± 10,1	0,5565
<b>Comorbilidades</b>				
HTA: n (%)	15 (40,5%)	19 (63,0%)	34 (50,7%)	0,0635
DM-2: n (%)	8 (21,6%)	4 (13,3%)	12 (17,9%)	0,3790
Tabaquismo: n (%)	22 (59,5%)	20 (66,6%)	42 (62,7%)	0,5441
Dislipidemia: n (%)	15 (40,5%)	10 (33,3%)	25 (37,3%)	0,5441
<b>Centro de enrolamiento</b>				
Hospital San Juan de Dios: n (%)	30 (81,0%)	20 (66,6%)	50 (74,6%)	0,1776
Hospital Clínico San Borja Arriarán: n (%)	3 (8,1%)	6 (20,0%)	9 (13,4%)	0,1558
Hospital Clínico Universidad de Chile: n (%)	4 (10,8%)	4 (13,3%)	8 (11,9%)	0,9513
<b>Arteria comprometida</b>				
Arteria descendente anterior: n (%)	18 (48,6%)	13 (43,3%)	31 (46,2%)	0,6644
Arteria coronaria derecha: n (%)	16 (43,2%)	10 (33,3%)	26 (38,8%)	0,4078
Arteria circunfleja: n (%)	3 (8,1%)	7 (23,3%)	10 (14,9%)	0,0820
<b>Tratamiento farmacológico previo al IAM</b>				
IECA y/o ARA-2: n (%)	11 (29,7%)	11 (36,7%)	22 (32,8%)	0,5477
Acido acetilsalicílico: n (%)	6 (16,2%)	9 (30,0%)	15 (22,3%)	0,1783
Bloqueadores beta-adrenérgicos: n (%)	2 (5,4%)	5 (16,7%)	7 (10,4%)	0,1340
Estatinas o fibratos: n (%)	6 (16,2%)	6 (20,0%)	12 (17,9%)	0,6879
Diuréticos: n (%)	1 (2,7%)	3 (10,0%)	4 (5,9%)	0,2100
Bloqueadores de canales de calcio: n (%)	1 (2,7%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)	0,3643
Inhibidores del receptor de aldosterona: n (%)	2 (5,4%)	2 (6,7%)	4 (5,9%)	0,8285

**Tabla 3. Características clínicas de pacientes aleatorizados que completaron el seguimiento con RNM precoz.** IMC: Índice de masa corporal. HTA: Hipertensión arterial. DM-2: Diabetes mellitus tipo 2. IECA: Inhibidores de enzima convertidor de angiotensina. ARA-2: Antagonistas del receptor de angiotensina 2. Tabaquismo se definió como consumo de cualquier cantidad de cigarrillos previo al infarto agudo de miocardio. Comparaciones entre grupos se realizaron por Chi-cuadrado para variables categóricas, y Student's t-test para variables continuas según corresponda, con GraphPad Prism 7,0. Los valores corresponden número absoluto de pacientes y porcentajes.

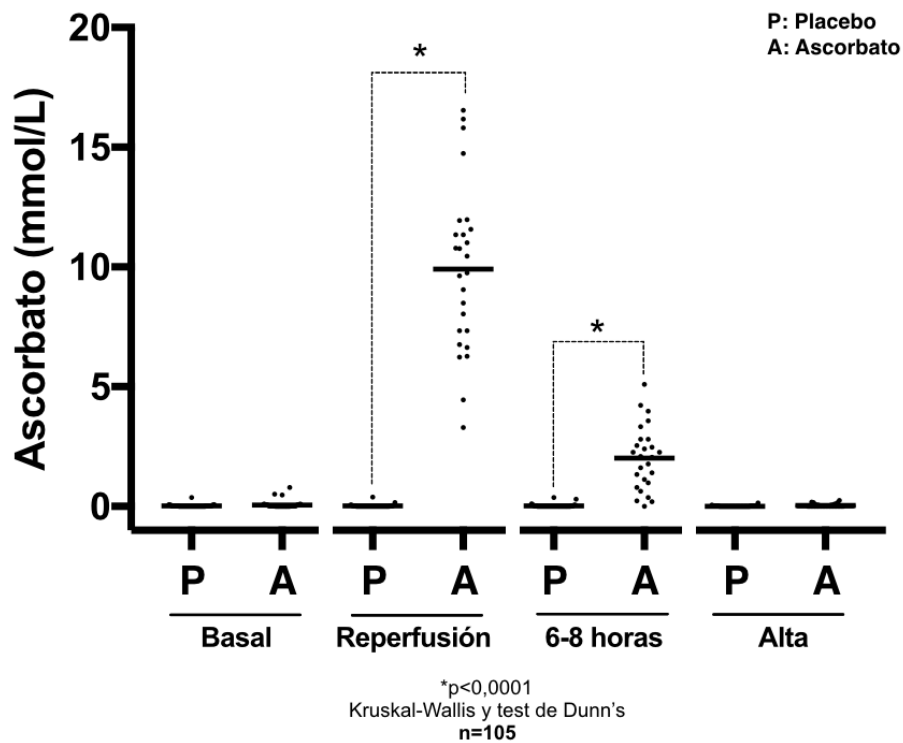
	Placebo	Ascorbato	Total	P value
Número de pacientes	22	22	44	0,5609
Edad promedio: años	56,4 ± 6,6	54,8 ± 9,2	55,8 ± 7,7	0,4943
Sexo masculino: n (%)	19 (86,3%)	18 (81,8%)	37 (84,1%)	0,6802
IMC: kg/m <sup>2</sup>	28,6 ± 5,1	27,9 ± 4,8	28,3 ± 4,9	0,7228
Tiempo IAM-RNM2: días	101,9 ± 24,5	111,8 ± 34,2	106,1 ± 29,0	0,2624
<b>Comorbilidades</b>				
HTA: n (%)	13 (59,1%)	13 (59,1%)	26 (59,1%)	0,9999
DM-2: n (%)	8 (36,4%)	4 (18,2%)	12 (27,3%)	0,1757
Tabaquismo: n (%)	18 (81,8%)	14 (63,6%)	32 (72,3%)	0,1757
Dislipidemia: n (%)	10 (45,5%)	6 (27,3%)	16 (36,4%)	0,2100
<b>Tratamiento posterior al IAM</b>				
IECA y/o ARA-2: n (%)	18 (81,8%)	16 (72,7%)	34 (77,3%)	0,4718
Acido acetilsalicílico: n (%)	21 (94,4%)	20 (90,1%)	41 (93,2%)	0,5498
Bloqueadores beta-adrenérgicos: n (%)	17 (77,3%)	18 (81,8%)	35 (79,5%)	0,7086
Estatinas o fibratos: n (%)	15 (68,2%)	13 (59,1%)	28 (63,6%)	0,5308
Diuréticos: n (%)	3 (13,6%)	6 (27,3%)	9 (20,4%)	0,2622
Bloqueadores de canales de calcio: n (%)	2 (9,1%)	1 (4,5%)	3 (6,8%)	0,5498
Inhibidores del receptor de aldosterona: n (%)	2 (9,1%)	3 (13,6%)	5 (11,3%)	0,6348
<b>Centro de enrolamiento</b>				
Hospital San Juan de Dios: n (%)	15 (68,2%)	14 (63,6%)	29 (65,9%)	0,7505
Hospital Clínico San Borja Arriarán: n (%)	3 (13,6%)	4 (18,2%)	7 (15,9%)	0,6802
Hospital Clínico Universidad de Chile: n (%)	4 (18,2%)	4 (18,2%)	8 (18,2%)	0,9999
<b>Arteria comprometida</b>				
Arteria descendente anterior: n (%)	10 (45,4%)	10 (45,4%)	20 (45,4%)	0,9999
Arteria coronaria derecha: n (%)	10 (45,4%)	8 (36,4%)	18 (40,9%)	0,5397
Arteria circunfleja: n (%)	2 (9,1%)	4 (18,2%)	6 (13,7%)	0,3796

**Tabla 4. Características clínicas de pacientes aleatorizados que completaron el seguimiento con RNM precoz y tardía.** IMC: Índice de masa corporal. HTA: Hipertensión arterial. DM-2: Diabetes mellitus tipo 2. IECA: Inhibidores de enzima convertidor de angiotensina. ARA-2: Antagonistas del receptor de angiotensina 2. Tabaquismo se definió como consumo de cualquier cantidad de cigarrillos previo al infarto agudo de miocardio. Comparaciones entre grupos se realizaron por Chi-cuadrado para variables categóricas, y Student's t-test para variables continuas según corresponda, con GraphPad Prism 7,0. Los valores corresponden numero absoluto de pacientes y porcentajes.

## 2. Parámetros bioquímicos de daño miocárdico, estrés oxidativo y defensas antioxidantes

### Ascorbato

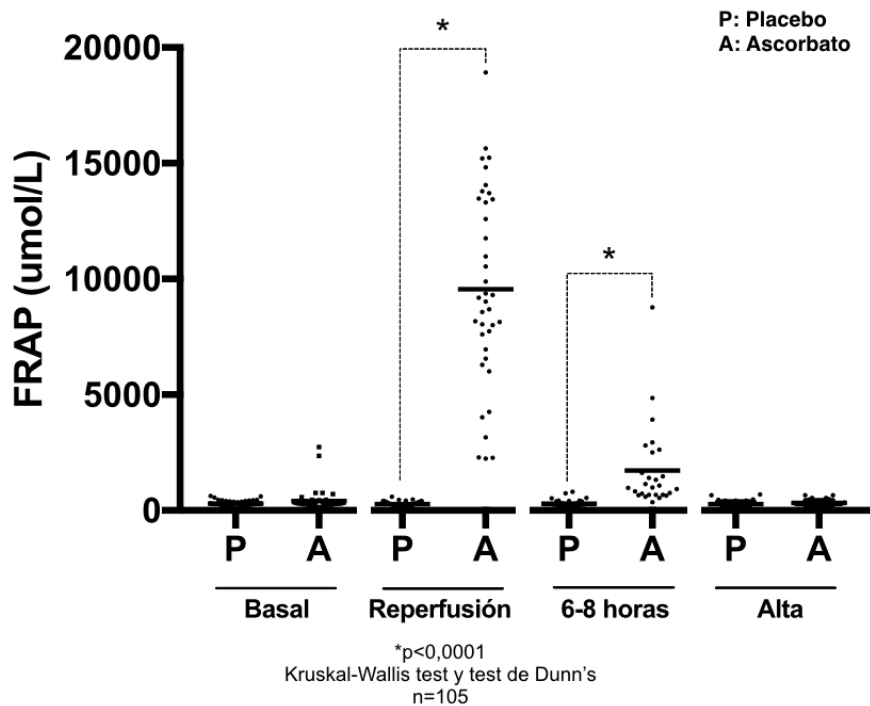
En la **Figura 4** se observa la concentración de AA en las 4 muestras tomadas a los pacientes. Hubo mayor concentración de AA en las muestras post reperfusión y 6-8 horas post reperfusión en grupo sometido a infusión con AA.



**Figura 4. Concentración de ascorbato en sangre periférica en pacientes aleatorizados.** P: Placebo. A: Ascorbato. Se tomaron cuatro muestras en condiciones basales (1), post reperfusión (2), 6-8 horas post reperfusión (3) y al momento del alta hospitalaria (4). En el eje horizontal está representado el número de la muestra y el grupo estudiado (P-placebo ó A-ascorbato). Análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 7,0.

### Ferric reducing ability of plasma

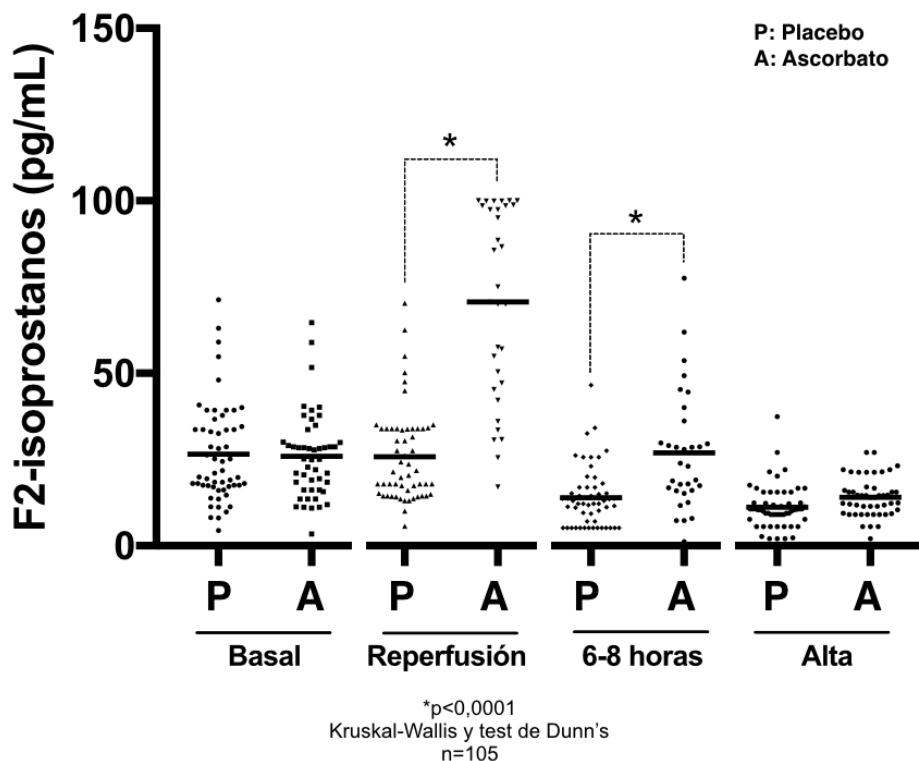
En la **Figura 5** se observa la capacidad antioxidante total del plasma (*ferric reducing ability of plasma*, FRAP) entre grupos en las cuatro muestras obtenidas. Se observa una concentración mayor de FRAP en muestra tomada inmediatamente y 6-8 horas post reperfusión en grupo sometido a infusión de AA comparado con placebo.



**Figura 5. Capacidad antioxidante en sangre periférica en pacientes aleatorizados.** P: Grupo Placebo (n=56). A: Grupo Ascorbato (n=49). Se tomaron cuatro muestras en condiciones basales (1), post reperfusión (2), 6-8 horas post reperfusión (3) y al momento del alta hospitalaria (4). En el eje horizontal está representado el número de la muestra y el grupo estudiado (P-placebo ó A-ascorbato). A: Niveles de FRAP (ferric reducing ability of plasma) en sangre periférica las distintas muestras. Análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 7,0.

## F2-isoprostanos

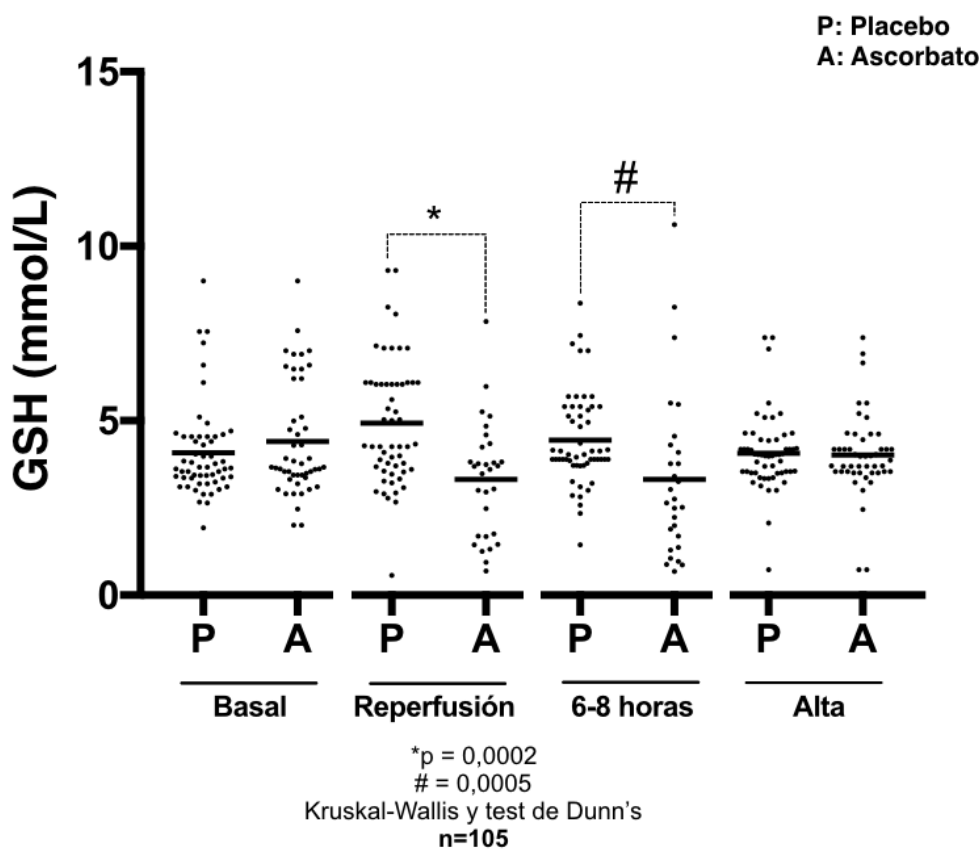
En la **Figura 6** se observa la concentración de F2-isoprostanos en sangre periférica entre grupos en las 4 muestras obtenidas de los pacientes en el protocolo. Hubo una concentración significativamente mayor en muestra tomada inmediatamente y 6-8 horas post reperfusión en el grupo sometido a AA comparado con placebo.



**Figura 6. Liperoxidación en sangre periférica en pacientes aleatorizados.** P: Grupo Placebo (n=56). A: Grupo Ascorbato (n=49). Se tomaron cuatro muestras en condiciones basales (1), post reperfusión (2), 6-8 horas post reperfusión (3) y al momento del alta hospitalaria (4). En el eje horizontal está representado el número de la muestra y el grupo estudiado (P-placebo ó A-ascorbato). Análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 7,0.

### Glutation reducido

En la **Figura 7** se observa la concentración de glutatión reducido (GSH) en sangre periférica entre grupos. Se observa una concentración significativamente menor de GSH en muestra tomada inmediatamente y 6-8 horas post reperusión en el grupo AA, comparado con placebo.



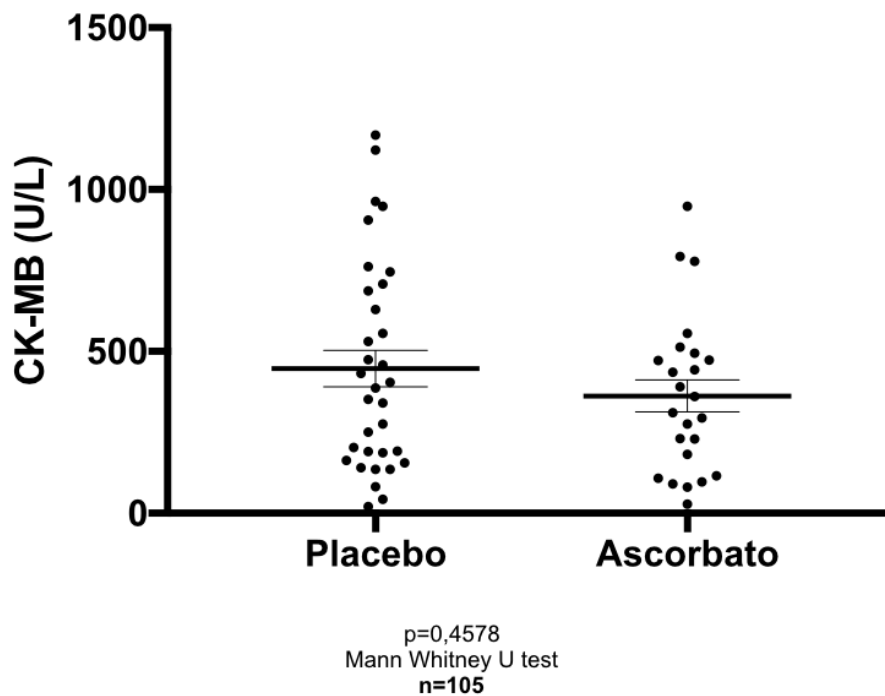
**Figura 7. Concentración de GSH en sangre periférica en pacientes aleatorizados.** P: Grupo Placebo (n=56). A: Grupo Ascorbato (n=49). Se tomaron cuatro muestras en condiciones basales (1), post reperusión (2), 6-8 horas post reperusión (3) y al momento del alta hospitalaria (4). En el eje horizontal está representado el número de la muestra y el grupo estudiado (P-placebo ó A-ascorbato). Análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 7,0.



### CK-MB post reperfusión

En la **Figura 8** se observan los niveles de creatin kinasa isoenzima MB (CK-MB) en muestra obtenida posterior a la reperfusión miocárdica obtenida por ACP. No hubo diferencias entre grupos AA y placebo en esta medición.

Se observó una correlación entre este biomarcador de daño miocárdico, tamaño de infarto y FE en RNM1. No hubo diferencias significativas en creatinina en sangre periférica entre grupos (**Anexo 4**).



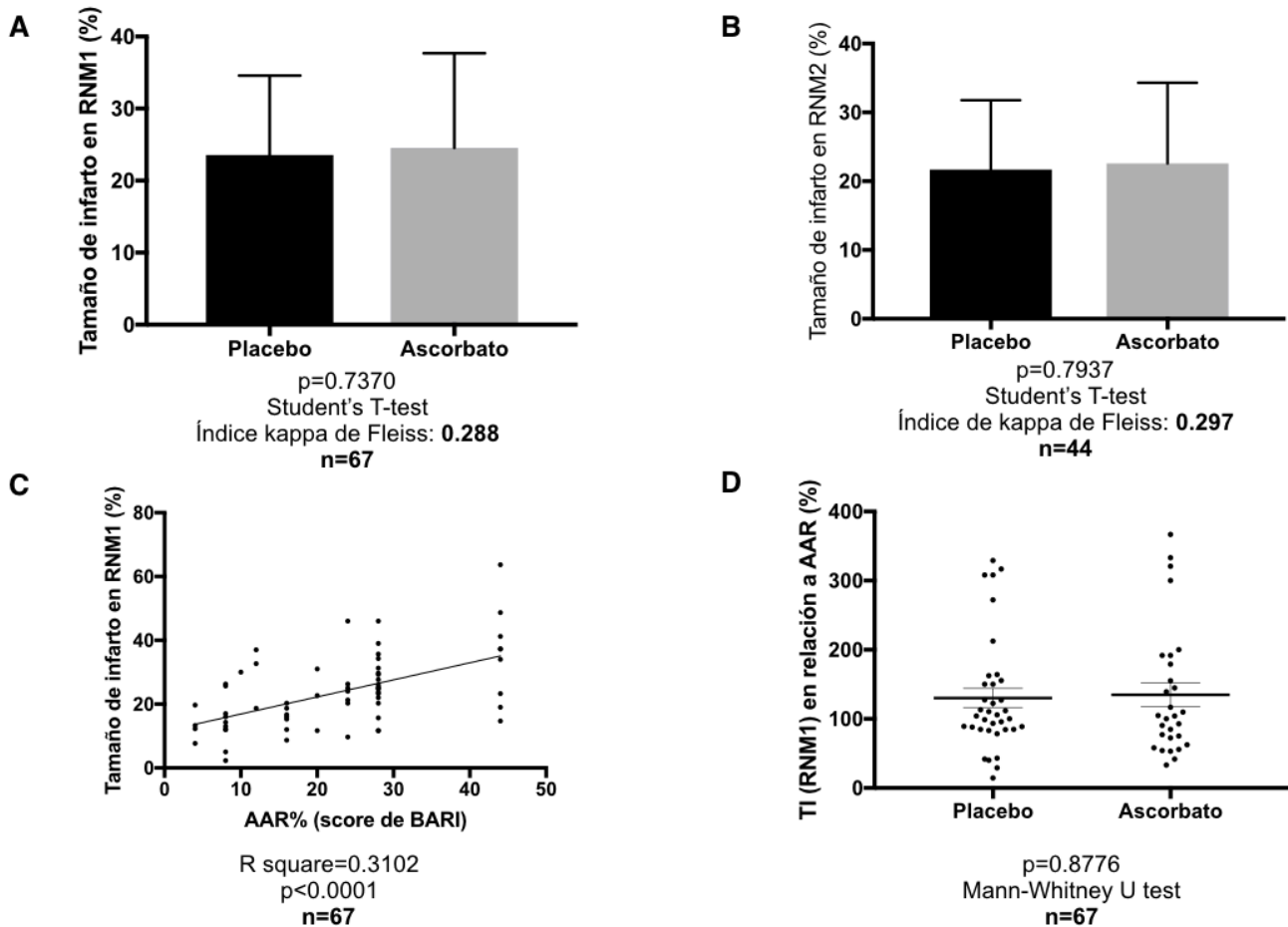
**Figura 8. Creatin kinasa isoenzima MB en sangre periférica post reperfusión entre grupos.** Se analizó una muestra tomada inmediatamente posterior a la reperfusión lograda por ACP. Análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 7,0, comparaciones realizadas con Mann-Whitney U-test. En cada gráfico se representa promedio y error estándar.

### 3. Tamaño de infarto y función ventricular

Para el análisis de tamaño de infarto todas las RNM fueron analizadas de manera independiente por tres expertos en Radiología de Tórax del Hospital Clínico Universidad de Chile, ciegos a información clínica. Cada Radiólogo asignó un puntaje al tamaño de infarto de manera independiente, y luego se obtuvo el promedio de cada medición. Se calculó el índice kappa de *Fleiss* para determinar la concordancia entre las mediciones de tamaño de infarto por RNM1 y RNM2. Las mediciones funcionales fueron analizadas por un Radiólogo especialista en Radiología de Tórax, ciego a información clínica. La RNM precoz fue realizada en promedio a los  $16,2 \pm 10,1$  días post IAM, sin diferencias entre grupos (**Tabla 3**), mientras que la RNM tardía fue realizada a los  $106,1 \pm 29,0$  días post IAM, sin diferencias entre grupos (**Tabla 4**).

#### *Morfológicos*

En la **Figura 9A-B** se observa el porcentaje de tejido miocárdico infartado (tamaño de infarto) determinado en RNM1 y RNM2, respectivamente. El tamaño de tejido miocárdico infartado se expresa como porcentaje de tejido infartado con respecto del total de la masa ventricular. No hubo diferencias en esta medición entre grupos en RNM1 ni RNM2, obtenido por Student's T-test. Se determinó el área miocárdica en riesgo (AAR) por el puntaje angiográfico de BARI (*The Bypass Angioplasty Revascularization Investigation*) [115, 116], que es una forma ampliamente validada de obtener el AAR según la arteria y el sector de la arteria afectada por el IAM. En la **Figura 9C** se observa una correlación entre el AAR determinada por el puntaje angiográfico de BARI y tamaño de infarto en RNM1. Una vez obtenida AAR según datos angiográficos, se determinó cociente entre tamaño de infarto y AAR (tamaño de infarto/AAR), que se muestra en la **Figura 9D**. No hubo diferencias en el tamaño de infarto normalizado por AAR entre grupos. No hubo variación del tamaño de infarto por edad ni por tiempo angorbalón (**Anexo 4**).



**Figura 9. Variables morfológicas obtenidas en RNM precoz y tardía.** A: Tamaño de infarto entre grupos en RNM1. Placebo ( $n=37$ ) y ascorbato ( $n=30$ ). B: Tamaño de infarto entre grupos en RNM2. Placebo ( $n=22$ ) y ascorbato ( $n=22$ ). C: Se obtuvo el área miocárdica en riesgo según el puntaje angiográfico de BARI. Correlación entre área miocárdica en riesgo y tamaño de infarto. D: Tamaño de infarto normalizado por área miocárdica en riesgo entre grupos. Placebo ( $n=37$ ) y ascorbato ( $n=30$ ). AAR: Área miocárdica en riesgo, calculada por puntaje angiográfico de BARI. TI: Tamaño de infarto medido en RNM1. Se analizó la variabilidad inter-observador de la medición de tamaño de infarto mediante la determinación del índice kappa de *Fleiss*. Se analizó significancia estadística según distribución paramétrica o no paramétrica de variables (Student's T-test o Mann-Whitney U-test, según corresponda). Análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 7,0. En A y B las barras representan el valor promedio y desviación estándar. En D se representa promedio y error estándar.

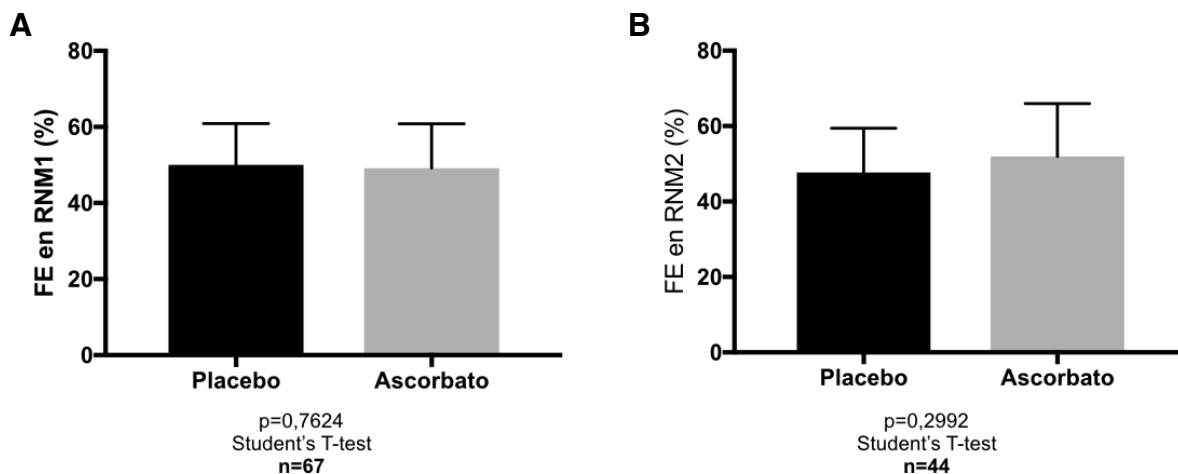
### *Análisis de variabilidad inter-observadores*

Se determinó la variabilidad interobservador en la determinación de tamaño de infarto en RNM1 y RNM2 mediante el índice kappa de *Fleiss* [106]. Se dividió el tamaño de infarto en cinco categorías y se determinó concordancia de cada uno de los tres observadores dentro de las cinco categorías. Para tamaño de infarto en RNM1 se obtuvo un índice kappa de *Fleiss* de 0,288 y en RNM2 de 0,297, ambos en rango aceptable.

### *Funcionales*

En la **Figura 10** se observa la fracción de eyección (FE) entre grupos (expresada como porcentaje) medida en RNM1 (**Figura 10A**) y RNM2 (**Figura 10B**). No hubo diferencias entre grupos en ambas mediciones. No hubo diferencias en volumen de fin de sístole (IFVS) ni volumen de fin de diástole (IFVD) entre grupos en RNM1 ni RNM2. Se observó una correlación negativa entre tamaño de infarto y FE en RNM1 (**Anexo 4**).

La obstrucción microvascular (OMV) es un parámetro recientemente descrito que se correlaciona con deterioro de función ventricular y eventos adversos cardiovasculares mayores post IAM [102, 103], su aparición es precoz y transitoria. No hubo diferencias estadísticamente significativas en OMV en RNM1 entre grupos. En RNM1 se observó una correlación de OMV con tamaño de infarto, y negativa con FE. Además los pacientes con OMV presente tuvieron mayor tamaño de infarto y menor FE en RNM1 (**Anexo 4**).

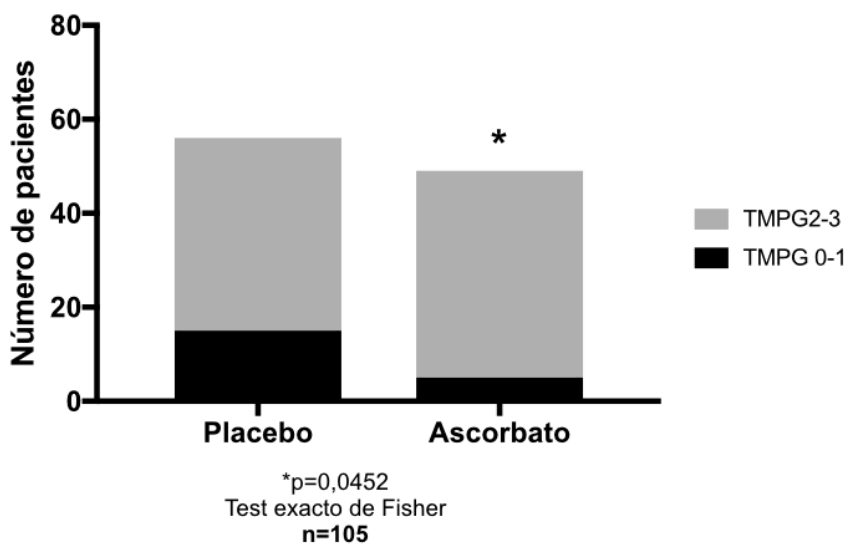


**Figura 10. Variables funcionales obtenidas en RNM precoz y tardía.** A: Fracción de eyección entre grupos en RNM1. B: Fracción de eyección entre grupos en RNM2. Se analizó significancia estadística según distribución paramétrica o no paramétrica de variables (Student's T-test o Mann-Whitney U-test, según corresponda). Análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 7,0. Las barras representan el valor promedio y desviación estándar.

#### 4. Reperusión angiográfica

A continuación se expresa el análisis de las coronariografías realizadas a los pacientes al momento de realizar ACP. El análisis estuvo a cargo de dos Cardiólogos intervencionales (Hemodinamistas) ciegos a información clínica, quienes revisaron las 105 películas de las coronariografías de los pacientes enrolados en el estudio. El análisis se realizó de manera conjunta, y se llegó a un consenso en cuanto al puntaje asignado. El *TIMI myocardial perfusion grade* es un marcador de perfusión ventricular posterior a ACP, que se correlaciona con morbilidad y mortalidad posterior a un IAM. Su puntaje es cualitativo, y va de 0 (menor perfusión ventricular) a 3 (perfusión ventricular óptima) [111]. Para su medición, al momento de analizar las películas de las coronariografías se le asignó un puntaje de TMPG2-3 (o perfusión miocárdica adecuada) o 0-1 (o perfusión miocárdica deteriorada), lo que se expresa en la **Figura 11**. Se observa en el

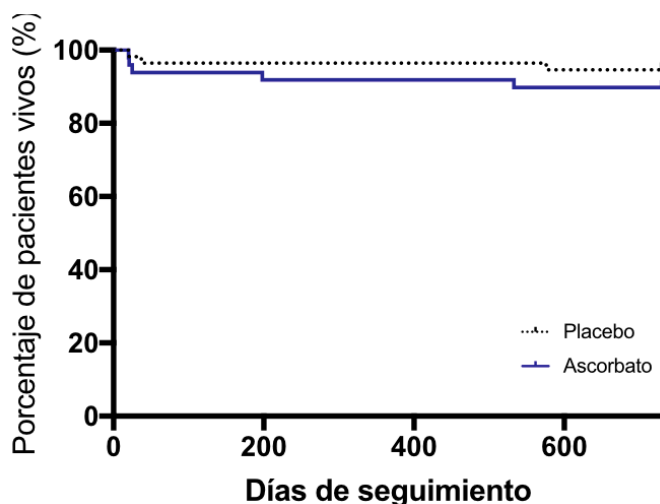
grupo AA un número significativamente mayor de pacientes a los que se le asignó puntaje TMPG 2-3 comparado con placebo. No hubo diferencias en corrected TIMI frame count [112] entre grupos (**Anexo 4**)



**Figura 11. TIMI myocardial perfusion grade entre grupos.** Número de pacientes que obtuvieron TMPG 2-3 versus el número de pacientes que obtuvieron TMPG 0-1, comparado entre grupos. Coronariografías fueron analizadas de manera conjunta por dos Hemodinamistas. Placebo (n=56) y ascorbato (n=49). Se analizó significancia estadística con test exacto de Fisher, con GraphPad Prism 7,0

## 5. Mortalidad

Para obtener dato de mortalidad a dos años se contactó a paciente y/o familiares por vía telefónica, y se revisaron antecedentes de mortalidad en Registro Civil de Chile. Se registró mortalidad general e incidencia de eventos cardiovasculares mayores (MACE) a dos años de seguimiento, por medio de una encuesta aplicada por vía telefónica al paciente o familiar de primer grado, por un operador ciego a información clínica. Se obtuvo respuesta telefónica en 76 pacientes (72,3% de los pacientes enrolados). No hubo diferencias en mortalidad a dos años entre grupos (**Tabla 1** y **Figura 12**). En el **Anexo 4** se muestra prevalencia de MACE a dos años (sin diferencias entre grupos) y el análisis detallado de los nueve pacientes fallecidos durante los dos años de seguimiento. Es importante señalar que el registro nacional GEMI [2] determinó un 11,7% de mortalidad a los 24 meses en pacientes con IAM tratados con ACP. En este estudio se obtuvo una mortalidad global de 8,57%, lo que se condice con los datos publicados previamente para población chilena.

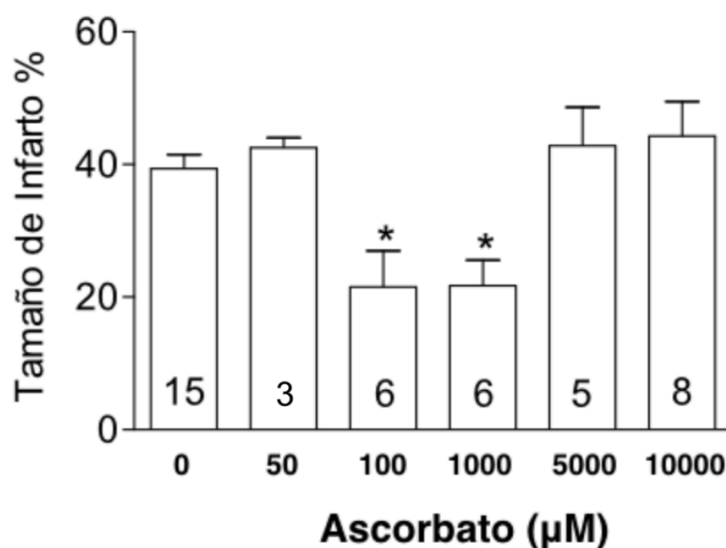


**Figura 12. Mortalidad a dos años post IAM.** Para registrar mortalidad de pacientes se revisaron registros clínicos y sitio web del Registro Civil de Chile. Se expresa porcentaje de pacientes vivos en curva de Kaplan Meier. No hubo diferencias entre grupos a dos años de seguimiento. Placebo (n=56) y Ascorbato (n=49). p value: 0,3383. Gráfico realizado y analizado con GraphPad Prism 7,0

## Etapa experimental

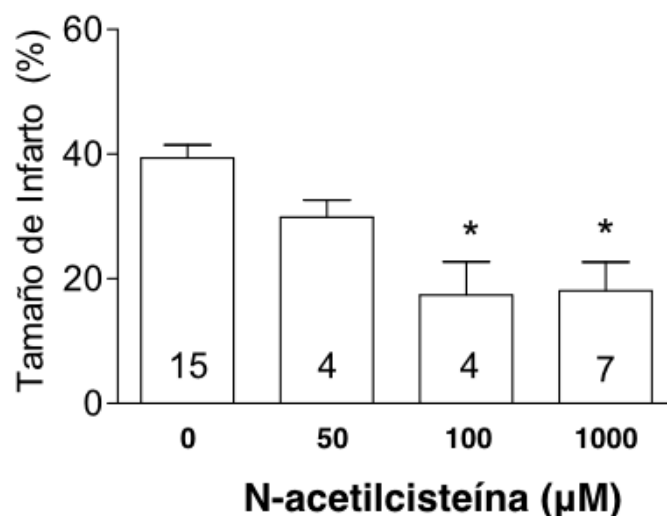
### 1. Curva dosis respuesta

En una primera etapa, se probó el efecto cardioprotector de cada fármaco por separado (AA, NAC y DFO) para así obtener para cada uno de ellos la dosis óptima con la que se puede obtener el mejor efecto cardioprotector en términos de tamaño de infarto. Se probaron dosis crecientes de AA, NAC y DFO en modelo de *Langendorff*, administradas durante la reperfusión miocárdica. Se determinó que el mejor efecto en reducir el tamaño de infarto y con la menor concentración posible se obtuvo con AA 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 13**), NAC 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 14**) y DFO 10  $\mu\text{M}$  (**Figura 15**). Se pudo observar un comportamiento bifásico del AA (**Figura 13**), sin tener cardioprotección a bajas dosis y perdiendo su capacidad cardioprotectora a altas dosis (presumiblemente por su interacción con hierro y el consumo de GSH, como fue descrito previamente).

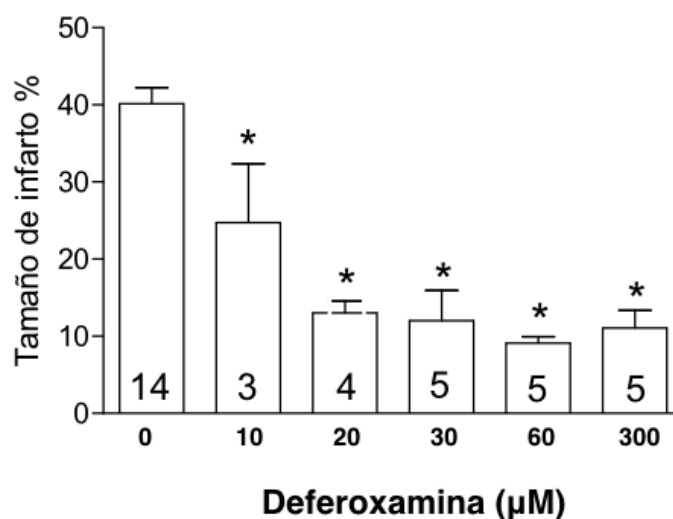


**Figura 13. Curva dosis respuesta del efecto de ascorbato en tamaño de infarto.** En eje horizontal se expresa la concentración de ascorbato en  $\mu\text{M}$  administrada en modelo murino ex vivo de *Langendorff*. Las barras representan el promedio y error medio estándar. El número dentro de las barras representa el número de experimentos. Comparaciones se realizaron con ANOVA y test post hoc de Tukey con GraphPad Prism 7,0. El asterisco sobre cada barra representa  $p < 0,05$  comparado con el grupo sin tratamiento (0).





**Figura 14. Curva dosis respuesta del efecto de N-acetilcisteína en tamaño de infarto.** En eje horizontal se expresa la concentración de N-acetilcisteína en µM administrada en modelo murino ex vivo de *Langendorff*. Las barras representan el promedio y error medio estándar. El número dentro de las barras representa el número de experimentos. Comparaciones se realizaron con ANOVA y test post hoc de Tukey con GraphPad Prism 7,0. El asterisco sobre cada barra representa  $p < 0,05$  comparado con el grupo sin tratamiento (0).



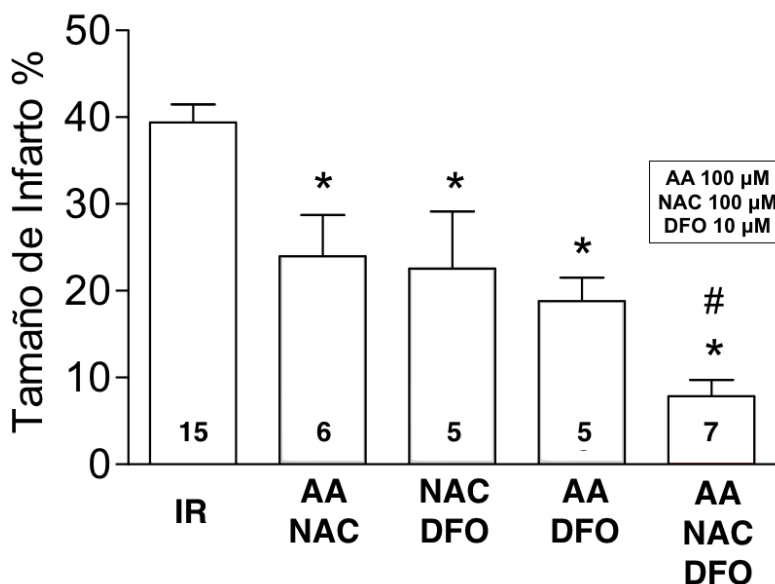
**Figura 15. Curva dosis respuesta del efecto de deferoxamina en tamaño de infarto.** En eje horizontal se expresa la concentración de deferoxamina en µM administrada en modelo murino ex vivo de *Langendorff*. Las barras representan el promedio y error medio estándar. El número dentro de las barras representa el número de experimentos. Comparaciones se realizaron con ANOVA y test post hoc de Tukey con GraphPad Prism 7,0. El asterisco sobre cada barra representa  $p < 0,05$  comparado con el grupo sin tratamiento (0).

## 2. Efectos cardioprotectores

Se probó el efecto cardioprotector de la triasociación entre AA, NAC y DFO en las concentraciones determinadas en la etapa anterior a nivel morfológico y funcional en modelo de *Langendorff*.

### *Efectos morfológicos*

Se probó el efecto cardioprotector de la triasociación AA-NAC-DFO (en concentraciones de 100, 100 y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente) a nivel de tamaño de infarto. En la **Figura 16** se muestra el efecto de las distintas combinaciones de AA, DFO y NAC (biasociaciones y triasociación) a nivel de tamaño de infarto en modelo de *Langendorff*. Se observó disminución del tamaño de infarto con el uso de bi- y triasociaciones de los antioxidantes. Además, la mayor disminución del tamaño de infarto fue con la triasociación de AA-DFO-NAC.



**Figura 16. Efecto sobre tamaño de infarto de biasociaciones y triasociación.** Se utilizaron las concentraciones cardioprotectoras óptimas de cada fármaco. Las barras representan el promedio y error medio estándar. El número dentro de las barras representa el número de experimentos. Comparaciones se realizaron con ANOVA y test post-hoc de Tukey con GraphPad Prism 7,0. El asterisco sobre cada barra representa  $p < 0,05$  comparado con el grupo sin tratamiento (barra blanca). #:  $p < 0,05$  vs. AA-NAC.

### *Efectos funcionales*

Se analizó el efecto funcional de la triasociación de AA-NAC-DFO, a nivel de función sistólica y diastólica.

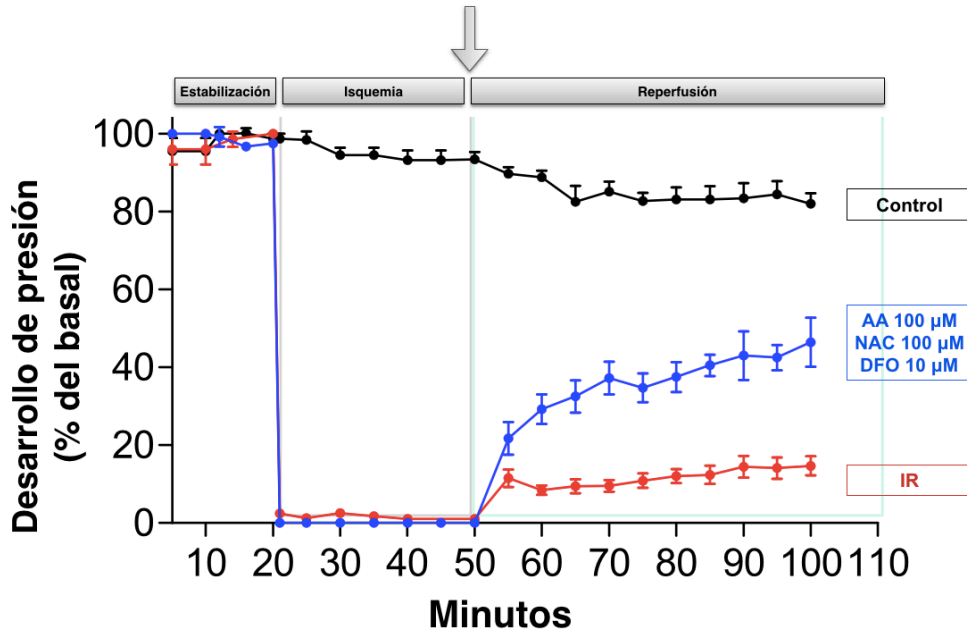
#### Porcentaje de recuperación del desarrollo de presión del ventrículo izquierdo

En la **Figura 17A** se muestra porcentaje de recuperación del desarrollo de presión (DP) con respecto al DP durante la estabilización y su evolución en el tiempo (estabilización-isquemia-reperfusión). Se observa una mayor recuperación del DP de las ratas sometidas a la terapia triasociada con AA-NAC-DFO (IR+T) con respecto al grupo sin tratamiento (IR). En la **Figura 17B** se cuantifica DP al final de la perfusión, observándose un DP significativamente mayor del grupo IR+T versus sin tratamiento.

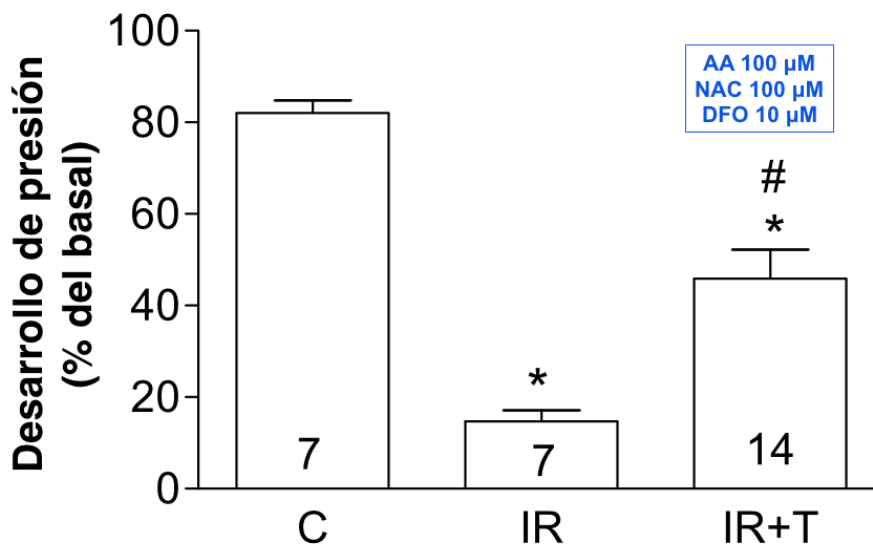
#### Presión de fin de diástole

En la **Figura 18A** se observa la evolución de la presión de fin de diástole (PFD) en el tiempo (estabilización-isquemia-reperfusión) en los grupos control, IR e IR+T. Se observa una PFD significativamente más baja en IR+T versus el grupo sin tratamiento. En la **Figura 18B** se cuantifica la PFD al final de la perfusión, obteniéndose PFD significativamente disminuida en las ratas sometidas a tratamiento (IR+T) con respecto a ratas sin tratamiento (IR).

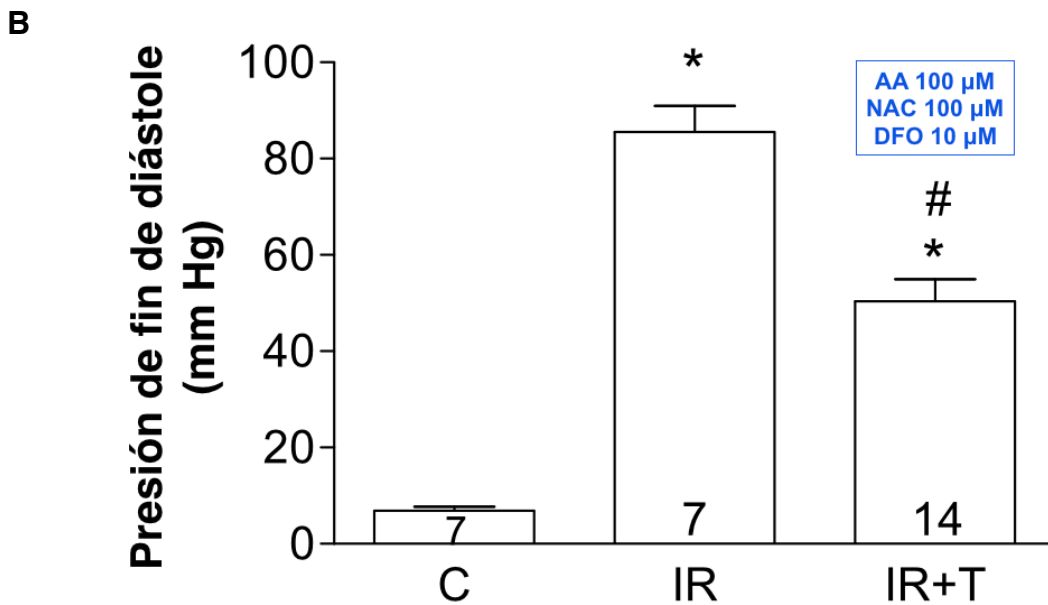
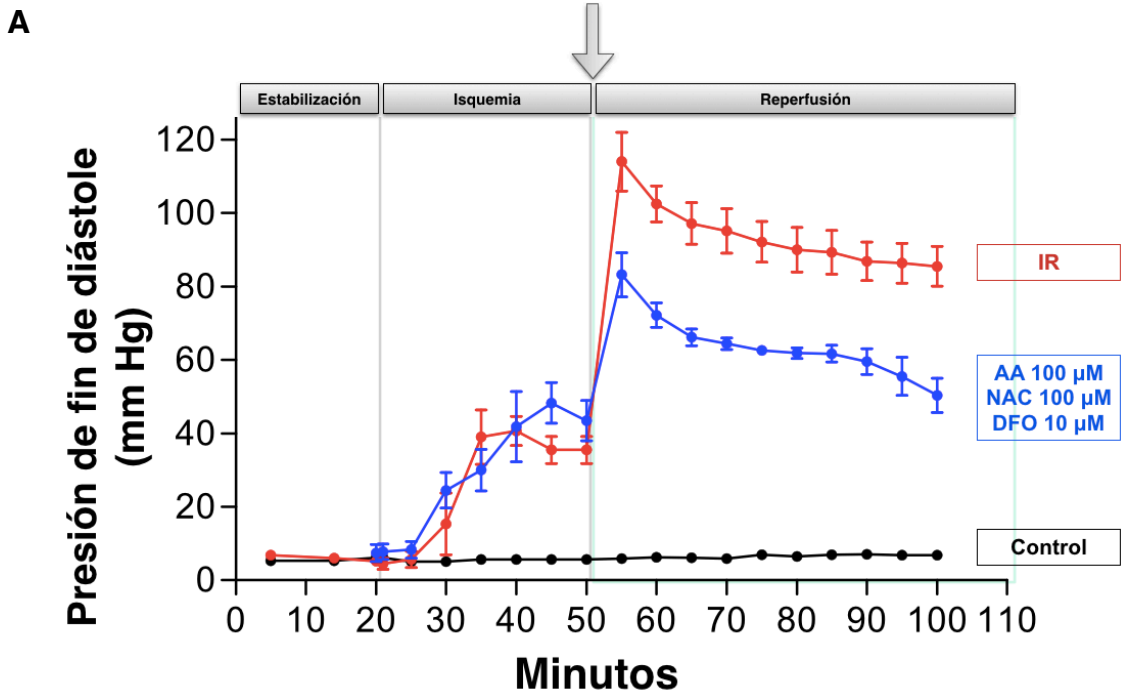
A



B



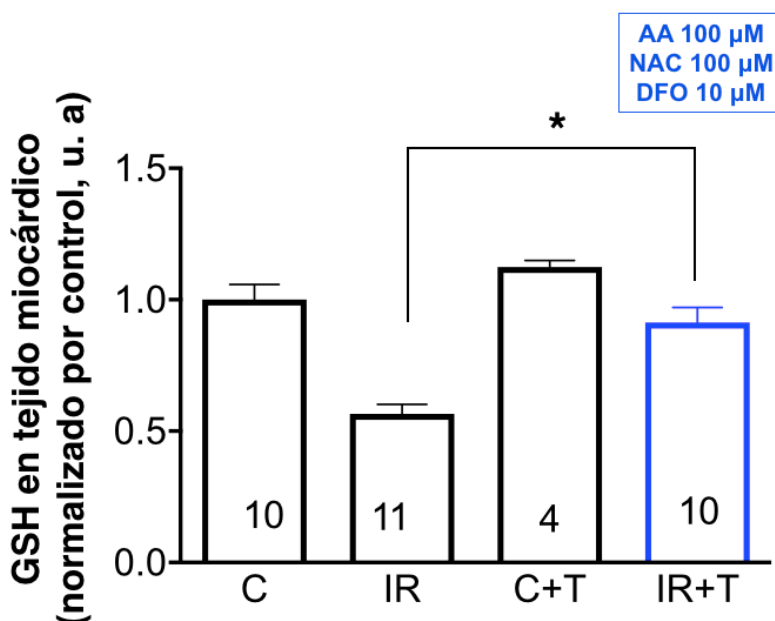
**Figura 17. Efecto del tratamiento triasociado con AA-NAC-DFO en recuperación del desarrollo de presión ventricular.** A: Porcentaje de recuperación del DP con respecto al basal (estabilización). B: Cuantificación del porcentaje de DP al final de la reperusión. Las barras representan el promedio y error medio estándar. Comparaciones se realizaron con ANOVA y test post-hoc de Tukey con GraphPad Prism 7,0. \*:  $p < 0,05$  con respecto a grupo control (C). #:  $p < 0,05$  con respecto a grupo sin tratamiento (IR). Las líneas sobre las barras representan error estándar.



**Figura 18. Efecto del tratamiento triasociado con AA-NAC-DFO en recuperación de la presión de fin de diástole.** A: Porcentaje de recuperación del PFD con respecto al basal (estabilización). B: Cuantificación del porcentaje de PFD al final de la reperusión. Las barras representan el promedio y error medio estándar. Comparaciones se realizaron con ANOVA y test post-hoc de Tukey con GraphPad Prism 7,0. \*:  $p < 0,05$  con respecto a barra control (C). #:  $p < 0,05$  con respecto a grupo sin tratamiento (IR). Las líneas sobre las barras representan error estándar.

### Efectos bioquímicos

En la **Figura 19** se observa la concentración de GSH en tejido miocárdico en ratas controles (C), IR sin tratamiento (IR), ratas controles con tratamiento (C+T) y ratas sometidas a IR con tratamiento triasociado (IR+T). Cantidad de GSH se expresa normalizado con respecto al contenido de GSH en ratas controles. Se observa que el grupo IR +T tiene un contenido mayor de GSH en tejido miocárdico con respecto al grupo IR. No se observaron diferencias en contenido de TBARS en tejido miocárdico entre grupo IR versus IR+T. No se detectó variación en residuos de nitrotirosina con la isquemia reperusión con respecto a control (**Anexo 5**).



**Figura 19. Contenido de GSH en tejido miocárdico en ratas sometidas a tratamiento triasociado con AA-NAC-DFO.** Se obtuvieron muestras de tejido miocárdico luego en experimento de *Langendorff*. Contenido de GSH se determinó por método de Griffith. Valores se expresan normalizados según el contenido de GSH en ratas controles. C: Control. IR: Isquemia reperusión sin tratamiento. C+T: Control con tratamiento. IR+T: Isquemia reperusión con tratamiento con AA-NAC-DFO. u. a.: Unidades arbitrarias. Las barras representan el promedio y error medio estándar. El número dentro de las barras representa el número de experimentos. Comparaciones se realizaron con ANOVA y test post-hoc de Tukey con GraphPad Prism 7,0. \*:  $p < 0,05$  con respecto a IR+T.

## **DISCUSIÓN**

Los hallazgos más importantes del presente estudio muestran que la terapia antioxidante con AA es capaz de atenuar parcialmente el DMR en pacientes con IAM sometidos a ACP, y que este efecto es capaz de optimizarse a través de su asociación con NAC y DFO en un modelo murino de isquemia reperfusión miocárdica.

### **Efecto del ascorbato en pacientes con IAM**

Previo a esta estudio, no se había realizado otro ensayo clínico en el que se haya administrado AA por vía intravenosa como estrategia para disminuir el DMR en pacientes con IAM sometidos a ACP. Dos estudios han administrado AA por vía intravenosa forma previo a un procedimiento de angioplastía coronaria percutánea, pero ninguno de estos protocolos ha sido utilizado en pacientes con IAM. Basili et al. [117] y Wang et al. [118] utilizaron AA por vía intravenosa en monoterapia en pacientes sometidos a angioplastía electiva (sin diagnóstico de IAM) demostrando un beneficio funcional angiográfico y un descenso de parámetros de estrés oxidativo.

Como se detalló anteriormente, el efecto antioxidante del AA ocurre a varios niveles [59-72], disminuyendo eficazmente la producción de ROS. Sin embargo, Jackson et al. mostró que la reducción efectiva del anión superóxido ocurre solo a altas concentraciones [76]. La concentración plasmática de AA en el plasma está estrechamente controlada y un exceso de AA se excreta de manera dosis dependiente, siendo su concentración completamente saturada a dosis de 400 mg al día, produciendo un estado estacionario de la concentración plasmática en aproximadamente 250  $\mu\text{M}$  [119]. Esta concentración no es suficiente para reducir a los aniones superóxido [76], por lo que la administración intravenosa podría considerarse como una alternativa válida para prevenir el DMR, dado que estas altas concentraciones son alcanzables sólo por vía parenteral. Los estudios de Padayatty et al. [77] y Riordan et al. [78] demuestran que el uso de altas dosis de AA por vía intravenosa es seguro, sin que se detecten eventos adversos.

Aunque el efecto antioxidante y cardioprotector del AA está ampliamente documentado, nuestros resultados mostraron un incremento en la lipoperoxidación en los pacientes sometidos a terapia con AA. A pesar de que los resultados de este estudio no muestran una disminución del tamaño de infarto con AA, se observó un beneficio funcional objetivado en mayor número de pacientes con TMPG óptimo, a pesar de ocurrir esto bajo un estrés oxidativo exacerbado. Por otra parte, no se objetivaron reacciones adversas atribuibles a la terapia con AA como insuficiencia renal o respiratoria. Se demostró un efecto cardioprotector asociado con mayor estrés oxidativo, el que está probablemente asociado al efecto pro oxidante de las altas dosis de AA [92]. Así, es posible que el desarrollo de lipoperoxidación se deba a la interacción de AA con el hierro liberado durante la reperfusión miocárdica en IAM [92] y que el descenso de GSH se explique por el consumo acoplado al reciclaje del ascorbato oxidado (radical ascorbilo) [94]. A pesar de estos hallazgos, se evidenció cardioprotección en pacientes sometidos a terapia con AA, posiblemente determinada por su capacidad de reducir eficazmente al  $O_2^\bullet$  generado en la reperfusión. Es plausible que este efecto cardioprotector esté siendo atenuado por su interacción con hierro que genera radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) [120]. Sin embargo, a pesar del aumento de la lipoperoxidación, la elevada capacidad antioxidante plasmática (determinada por FRAP) da cuenta del mayor poder reductor presente en los pacientes tratados. Si bien este efecto no incide en la reducción del  $OH^\bullet$ , pudiera haber un aumento en la biodisponibilidad de NO al inhibir eficazmente su interacción con el  $O_2^\bullet$  [114]

### *Importancia del TMPG*

Si bien no hubo beneficio de la terapia con AA a nivel de tamaño de infarto, la terapia con antioxidantes en pacientes con IAM se asoció a mayor número de pacientes con TMPG óptimo. Se ha demostrado ampliamente la importancia del TMPG como predictor de morbilidad y mortalidad después del IAM. En los estudios de Gibson et al. [121, 122] queda en evidencia que un TMPG óptimo post IAM se asocia con mejor pronóstico a mediano y largo plazo post IAM.



## **Optimización de la terapia antioxidante**

Tomando en cuenta todo lo anterior, se desarrollaron experimentos con DFO y NAC para optimizar el efecto cardioprotector del AA vislumbrado en la etapa clínica. Mediante curvas dosis-respuesta se determinó entonces la menor concentración de cada fármaco por separado que obtuviera el mejor efecto, y luego se probó la bi y triasociación de estos fármacos, obteniéndose una reducción significativa del tamaño del infarto, y una mejoría en función sistólica y diastólica de las ratas sometidas a tratamiento, lo que se asoció a una mayor disponibilidad de GSH en tejido miocárdico.

### *Curvas dosis respuesta*

Los experimentos para probar el efecto de dosis crecientes de AA en tamaño de infarto en modelo de *Langendorff* mostraron un efecto cardioprotector bifásico. El AA carece de efecto cardioprotector en bajas dosis, y su efecto protector aparece con dosis moderadas, entre 100 y 1000  $\mu\text{M}$ . Este efecto favorable a nivel de tamaño de infarto se pierde con altas dosis de AA posiblemente porque predomina el efecto pro oxidante del AA por su reacción con hierro [120] y por la depleción de GSH anteriormente descrita.

Se ajustaron las dosis de DFO administradas durante la reperfusión basados en los experimentos de Badylak et al. [123], Ambrosio et al. [41] y Katoh et al. [124], administrándose una dosis de 10 a 100  $\mu\text{M}$  de DFO para titular el efecto cardioprotector. Se observó que dosis de 10  $\mu\text{M}$  son suficientes para observar un claro efecto cardioprotector con DFO. La necesidad de bajas dosis de DFO para observar un efecto cardioprotector optimiza su aplicación clínica, dado que DFO tiene un alto volumen de distribución, descendiendo rápidamente sus dosis a niveles valle luego de su administración, basados en la curva farmacocinética descrita por Porter et al. [98]. Para NAC se ajustaron las concentraciones administradas basados en los experimentos de Peng et al. [79], utilizando concentraciones entre 10 y 100  $\mu\text{M}$ , encontrándose un óptimo efecto cardioprotector con concentraciones de 100  $\mu\text{M}$ .

### *Experiencias previas*

No se han desarrollado previamente experiencias clínicas con la aplicación combinada de estos fármacos en pacientes con IAM, sino que sólo administrados de forma aislada. Con AA se desarrollaron los estudios de Basili et al. [117] y Wang et al. [118] previamente descritos en angioplastia electiva, con resultados parciales a nivel de cardioprotección. En cuanto a DFO, Reddy et al. [88] administró 50 mg/kg de DFO (3,5 gramos para un individuo de 70 kg) en pacientes con IAM tratados con ACP, obteniéndose menores niveles de estrés oxidativo, pero sin beneficio morfológico ni funcional. En lo que respecta a NAC, el estudio NACIAM de Pasupathy et al. [57] demostró una clara disminución del tamaño de infarto medido por RNM luego de la administración de NAC.

En lo que respecta a modelos animales, la única investigación similar publicada que evaluó el efecto combinado de AA-NAC-DFO en isquemia reperfusión miocárdica fue publicada por Nikas et al. [125], en modelo porcino *in vivo* de isquemia reperfusión. En dicho estudio se infundió una mezcla de bajas dosis de los tres compuestos (AA, DFO y NAC, solos y en combinación), sin evidenciar efecto cardioprotector morfológico ni bioquímico. Las principales diferencias de estos experimentos con los presentados por Nikas et al. radican en que no se realizaron curvas dosis respuesta de cada compuesto por separado antes de formular su mezcla. Más aún, los tres fármacos se administraron en dosis que (según volumen de distribución y peso de los porcinos utilizados) alcanzan bajas concentraciones plasmáticas de cada fármaco. En segundo lugar, la administración de los fármacos fue desde 15 minutos antes de la reperfusión, y por solo 5 minutos luego del inicio de la reperfusión, por lo que no es esperable que proteja al tejido en la etapa en que se produce el mayor daño (30 minutos post reperfusión) [22]. Con respecto al estudio de Nikas et al., los resultados aquí presentados tienen la fortaleza de que se determinaron curvas dosis respuesta de cada fármaco por separado, para así conocer la concentración óptima a la que se obtiene el mayor efecto cardioprotector. Además, la terapia fue administrada durante 50 minutos post reperfusión.

### *Efecto optimizado*

En los experimentos aquí descritos se demuestra una optimización del efecto cardioprotector del AA a nivel morfológico y funcional, gracias a su coadministración junto NAC y DFO en concentraciones que podrían ser alcanzables en el ser humano a través la administración de bajas dosis de estos fármacos por vía intravenosa, con tres compuestos de conocida inocuidad y amplio uso en medicina humana.

Se evidenció además un aumento en los niveles de GSH disponible en tejido miocárdico, lo que va en concordancia con la optimización del reciclaje de ascorbato por la administración de NAC [94]. No se objetivó un descenso en el contenido de TBARS con el tratamiento activo, por lo que la cardioprotección observada con la triasociación de AA, NAC y DFO pudiera ser explicada a través de otros múltiples procesos, principalmente la inhibición de mecanismos de necrosis y apoptosis asociados al DMR. Además es posible que el efecto antioxidante pueda estar a nivel de evitar la oxidación de otras proteínas claves en el funcionamiento celular [58]. La apertura del poro de transición en mitocondrial juega un rol preponderante en el desarrollo de apoptosis asociada al DMR [126-130], por lo que es plausible plantear que la acción de AA [131], NAC [132, 133] y DFO [134] también pueda desarrollarse a este nivel. Por otra parte, es bien sabido que las enzimas del sistema de respiración celular mitocondrial son un objetivo mayor de la toxicidad por hierro asociada al DMR [135], por lo que es posible que la actividad protectora de DFO esté enfocada en la quelación de hierro principalmente a nivel mitocondrial [136-138].

Este estudio traslacional abre la posibilidad de prevenir el DMR asociado al IAM mediante la administración de una triasociación de bajas concentraciones de antioxidantes de amplio uso clínico, conocida inocuidad y bajo costo, logrando un beneficio morfológico, funcional y bioquímico a nivel miocárdico. Además crea la oportunidad de producir un compuesto farmacéutico de bajo volumen y costo, que se pueda administrar junto a la terapia de reperfusión miocárdica en pacientes afectados por IAM, lo que se debe corroborar en futuros estudios clínicos y farmacológicos prospectivos y aleatorizados en pacientes afectados con IAM.

## Limitaciones

- No se alcanzó el número de pacientes definido inicialmente en el cálculo de tamaño muestral, tomando como *outcome* primario el tamaño de infarto en RNM1. Hubo un 63,8% de pacientes que completaron seguimiento con RNM1, y un 41,9% que completó el seguimiento con RNM2. El no poder realizar RNM en todos los pacientes enrolados (por limitaciones propias del examen) pudo haber impactado en los resultados obtenidos a nivel de RNM, quitándole poder estadístico. La tasa de realización de RNM está acorde a los trabajos previamente publicados que utilizan RNM para estudio de complicaciones post IAM [57], pérdida de pacientes derivada de la complejidad de la realización de este examen.
- La RNM1 se realizó en promedio  $16,2 \pm 10,1$  días posterior al IAM. Se ha documentado que la medición de tamaño de infarto en RNM varía según la cantidad de moléculas de agua en el tejido miocárdico (y esta a su vez varía según la cantidad de días post IAM), siendo óptima la medición a los 2-7 días posterior al IAM [105]. Aunque la ventana temporal para la determinación de tamaño de infarto por RNM1 no fue la óptima, no hubo diferencias significativas entre grupos.
- En determinación de MACE se realizó entrevista telefónica para categorizar el evento, lo que podría haber alterado la información del evento (tales como los síntomas de insuficiencia cardíaca, que dependen de la subjetividad del paciente). No se realizó seguimiento prospectivo de los pacientes. En este sentido, se contactó retrospectivamente al 72,3% de los pacientes enrolados.
- A pesar de múltiples intentos, no se concretó una medición fidedigna de niveles hierro libre (o *labile iron pool*, LIP) luego de IR. Se intentó realizar la medición con técnica colorimétrica con kit Fer-color AA (*Wiener Lab*), pero las variaciones en LIP están bajo el límite de detección de esta técnica. Una técnica de mayor sensibilidad para la detección de los cambios intracelulares en hierro es la espectroscopia atómica [36], técnica no disponible actualmente para su realización en nuestro laboratorio.

- Al determinar estrés nitrosativo, no se encontraron diferencias en residuos de nitrotirosina entre grupo control e isquemia reperfusión sin tratamiento, esto porque la técnica utilizada (*western blot*) no fue capaz de encontrar variaciones en la presencia de residuos de nitrotirosina inducidas por la IR, lo que limita la interpretación del experimento (**Anexo 5**).

## CONCLUSIÓN

En pacientes con IAM sometidos a ACP la administración de AA por vía intravenosa previo a la reperfusión miocárdica mejora parámetros de reperfusión angiográfica (TMPG), sin impactar en tamaño de infarto ni fracción de eyección (medido por RNM precoz y tardía). Esto asociado a aumento de la lipoperoxidación y disminución de concentración de GSH en sangre periférica.

En modelo murino de *Langendorff*, el efecto cardioprotector del AA se optimiza a través de su coadministración con NAC y DFO, utilizado en concentraciones de 100, 100 y 10  $\mu\text{M}$  para AA, NAC y DFO respectivamente, mostrando menor tamaño de infarto, mejor función sistólica y diastólica, y mayor concentración de GSH en tejido miocárdico.

Los resultados de estos estudio traslacional sientan las bases para el desarrollo de una terapia farmacológica racional con bajas dosis de tres fármacos de conocida seguridad clínica, bajo costo y extendido uso en medicina humana para prevenir el DMR asociado al IAM.

## REFERENCIAS

- 1. Prieto, J. C.; Sanhueza, C.; Martínez, N.; Nazzal, C.; Corbalán, R.; Cavada, G.; Lanas, F.; Bartolucci, J. and Campos, P. "In-hospital mortality after ST-segment elevation myocardial infarction according to reperfusion therapy". *Rev Med Chil.* 136: 143-150, 2008.
- 2. Corbalán, R.; Nazzal, C.; Prieto, J. C.; Chávez, E.; Lanas, F.; Lamich, R.; Bartolucci, J.; Montaña, R. and Cumsille, F. "Reduction of myocardial infarction mortality in Chilean hospitals". *Rev Med Chil.* 130: 368-378, 2002.
- 3. Volpi, A.; De Vita, C.; Franzosi, M. G.; Geraci, E.; Maggioni, A. P.; Mauri, F.; Negri, E.; Santoro, E.; Tavazzi, L. and Tognoni, G. "Determinants of 6-month mortality in survivors of myocardial infarction after thrombolysis. Results of the GISSI-2 data base. The Ad hoc Working Group of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-2 Data Base". *Circulation.* 88: 416-429, 1993.
- 4. Braunwald, E. "Myocardial reperfusion, limitation of infarct size, reduction of left ventricular dysfunction, and improved survival: should the paradigm be expanded?". *Circulation.* 79: 441-444, 1989.
- 5. Van de Werf, F.; Ardissino, D.; Betriu, A.; Cokkinos, D. V.; Falk, E.; Fox, K. A.; Julian, D.; Lengyel, M.; Neumann, F. J.; Ruzyllo, W.; Thygesen, C.; Underwood, S. R.; Vahanian, A.; Verheugt, F. W. and Wijns, W. "Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation". *Eur Heart J.* 24: 28-66, 2003.
- 6. Roger, V. L.; Go, A. S.; Lloyd-Jones, D. M.; Adams, R. J.; Berry, J. D.; Brown T. M.; Carnethon, M. R.; Dai, S.; de Simone, G.; Ford, E. S.; Fox, C. S.; Fullerton, H. J.; Gillespie, C.; Greenlund K. J.; Hailpern, S. M.; Heit, J. A.; Ho, P. M.; Howard, V. J.; Kissela, B. M.; Kittner, S. J.; Lackland, D. T.; Lichtman, J. H.; Lisabeth, L. D.; Makuc, D. M.; Marcus, G. M.; Marelli, A.; Matchar, D. B.; McDermott, M. M.; Meigs, J. B.; Moy, C. S.; Mozaffarian, D.; Mussolino, M. E.; Nichol, G.; Paynter, N. P.; Rosamond, W. D.; Sorlie, P. D.; Stafford, R. S.; Turan, T. N.; Turner, M. B.; Wong, N. D. and Wylie-Rosett, J. "American Heart

Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association" *Circulation*. 123: 18-209, 2011.

- 7. Grines, C. L.; Browne, K. F.; Marco, J.; Rothbaum, D.; Stone, G. W.; O'Keefe, J.; Overlie, P.; Donohue, B.; Chelliah, N.; Timmis, G. C.; Vlietstra, R.; Strzelecki, M.; Puchrowicz-Ochocki, S. and O'Neill, W. W. "A comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction". *N Engl J Med*. 328: 673-679, 1993.
- 8. Weaver, W. D.; Simes, R. J.; Betriu, A.; Grines, C. L.; Zijlstra, F.; Garcia, E.; Grinfeld, L.; Gibbons, R. J.; Ribeiro, E. E.; DeWood, M. A. and Ribichini, F. "Comparison of primary coronary angioplasty and intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction a quantitative review". *JAMA*. 278: 2093-2098, 1997.
- 9. Andersen, H. R.; Nielsen, T. T.; Rasmussen, K.; Thuesen, L.; Kelbaek, H.; Thayssen, P.; Abildgaard, U.; Pedersen, F.; Madsen, J. K.; Grande, P.; Villadsen, A. B.; Krusell, L. R.; Haghfelt, T.; Lomholt, P.; Husted, S. E.; Vigholt, E.; Kjaergard, H. K. and Mortensen, L. S. "DANAMI-2 Investigators. A comparison of coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction". *N Engl J Med*. 349: 733, 2003.
- 10. Stone, G. W.; Brodie, B. R.; Griffin, J. J.; Constantini, C.; Morice, M. C.; St Goar, F. G.; Overlie, P. A.; Popma, J. J.; McDonnell, J.; Jones, D.; O'Neill, W. W. and Grines, C. L. "Clinical and angiographic follow-Up after primary stenting in acute myocardial infarction: the Primary Angioplasty in Myocardial Infarction (PAMI) stent pilot trial". *Circulation*. 99: 1548-1545, 1999.
- 11. Yellon, D. M. and Downey, J. M. "Current research views on myocardial reperfusion and reperfusion injury". *Cardioscience*. 1: 89-98, 1990.
- 12. Yellon, D. M. and Hausenloy, D. J. "Myocardial reperfusion injury". *N Engl J Med*. 357: 1121-1135, 2007.
- 13. Rodrigo, R.; Libuy, M.; Feliú, F. and Hasson, D. "Molecular basis of cardioprotective effect of antioxidant vitamins in myocardial infarction". *Biomed Res Int*. 2013: 437613, 2013.



- 14. Rodrigo, R.; Prieto, J. C. and Castillo, R. "Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications". *Clin Sci (Lond)*. 124: 1-15, 2013.
- 15. Herrick, J. B. "Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries". *JAMA*. 250: 1757-1765, 1983.
- 16. Piper, H. M.; Garcia-Dorado, D. and Ovize, M. "A fresh look at reperfusion injury". *Cardiovasc Res*. 38: 291-300, 1998.
- 17. Tatli, E.; Alicik, G.; Buturak, A.; Yilmaztepe, M. and Aktoz, M. "Arrhythmias following revascularization procedures in the course of acute myocardial infarction: are they indicators of reperfusion or ongoing ischemia?" *ScientificWorldJournal*. 2013: 160380, 2013.
- 18. Bolli, R. "Mechanisms of myocardial «stunning»". *Circulation*. 82: 723-738, 1990.
- 19. Kloner, R. A.; Ganote, C. E. and Jennings, R. B. "The 'no-reflow' phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog". *J Clin Invest*. 54: 1496-1508, 1974.
- 20. Juránek, I. and Bezek, S. "Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species--cause or consequence of tissue injury?" *Gen Physiol Biophys*. 24: 263-278, 2005.
- 21. Venardos, K. M.; Perkins, A.; Headrick, J. and Kaye, D. M. "Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review". *Curr Med Chem*. 14: 1539-1549, 2007.
- 22. Vanden Hoek, T. L.; Li, C.; Shao, Z; Schumacker, P. T. and Becker, L. B. "Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion". *J Moll Cell Cardiol*. 29: 2571-2583, 1997
- 23. Braunersreuther, V.; Montecucco, F.; Asrih, M.; Pelli, G.; Galan, K.; Frias, M.; Bruger, F.; Quinderé, A. L.; Montessuit, C.; Krause, K. H.; Mach, F. and Jaquet, V. "Role of NADPH oxidase isoforms NOX1, NOX2 and NOX4 in myocardial ischemia/reperfusion injury". *J Mol Cell Cardiol*. 64: 99-107, 2013.

- 24. Chen, J. X.; Zeng, H.; Tuo, O. H.; Yu, H.; Meyrick, B. and Aschner, J. L. "NADPH oxidase modulates myocardial Akt, ERK1/2 activation, and angiogenesis after hypoxia- reoxygenation". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292: 1664-1674, 2007.
- 25. Tao, L.; Gao, E.; Jiao, X.; Yuan, Y.; Li, S.; Christopher, T. A.; Lopez, B. L.; Koch, W.; Chan, L.; Goldstein, B. J. and Ma, X. L. "Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/ reperfusion involves the reduction of oxidative/ nitrative stress". *Circulation*. 115: 1408-1416, 2007.
- 26. Fukui, T.; Yoshiyama, M.; Hanatani, A.; Omura, T.; Yoshikawa, J. and Abe, Y. "Expression of p22-phox and gp91-phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction". *Biochem Biophys Res Commun*. 281: 1200-1206, 2001.
- 27. Krijnen, P. A.; Meischl, C.; Hack, C. E.; Meijer C. J.; Visser, C. A.; Roos, D. and Niessen, H. W. "Increased Nox2 expression in human cardiomyocytes after acute myocardial infarction". *J Clin Pathol*. 56: 194-199, 2003.
- 28. Kinugawa, S.; Post, H.; Kaminski, P. M.; Zhang, X.; Xu, X.; Huang, H.; Recchia, F. A.; Ochoa, M.; Wolin, M. S.; Kaley, G. and Hintze, T. H. "Coronary microvascular endothelial stunning after acute pressure overload in the conscious dog is caused by oxidant processes: the role of angiotensin II type 1 receptor and NAD(P)H oxidase". *Circulation*. 108: 2934-2940, 2003
- 29. Thompson-Gorman, S. L. and Zweier, J. L. "Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury". *J Biol Chem*. 265: 6656-6663, 1990.
- 30. Kang, S. M.; Lim, S.; Song, H.; Chang, W.; Lee, S.; Bae, S. M.; Chung, J. H.; Lee, H.; Kim, H. G.; Yoon, D. H.; Kim, T. W.; Jang, Y.; Sung, J. M., Cung, N. S.; and Hwang, K. C. "Allopurinol modulates reactive oxygen species generation and Ca<sup>2+</sup> overload in ischemia-reperfused heart and hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes". *Eur J Pharmacol*. 535: 212-219, 2006.
- 31. Zhao, X.; Chen, Y. R.; He, G.; Zhang, A.; Druhan, L. J.; Strauch, A. R.; and Zweier, J. L. "Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) knockout decreases NOS2 induction, limiting hyperoxygenation and conferring protection in the postischemic heart". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292: 1541-1550, 2007.

- 32. Levraut, J.; Iwase, H.; Shao, Z. H.; Vanden Hoek, T. L. and Schumacker, P. T. "Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284: 549-558, 2003.
- 33. Chevion, M.; Jiang, Y.; Har-El, R.; Berenshtein, E.; Uretzky, G. and Kitrossky, N. "Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 1102-1106, 1993.
- 34. Korkmaz, S.; Barnucz, E.; Loganathan, S.; Li, S.; Radovits, T.; Hegedus, P.; Zubarevich, A.; Hirschberg, K.; Weymann, A.; Puskás, L. G.; Ózsvári, B.; Faragó, N.; Kanizsai, I.; Fábrián, G.; Gyuris, M.; Merkely, B.; Karck, M.; Szabó, C. and Szabó, G. "Q50, an iron-chelating and zinc-complexing agent, improves cardiac function in rat models of ischemia/reperfusion-induced myocardial injury". *Circ J*. 77: 1817-1826, 2013.
- 35. Esposito, B. P.; Breuer, W.; Sirankapracha, P.; Pootrakul, P.; Hershko, C.; and Cabantchik, Z. I. "Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation". *Blood*. 102: 2670-2677, 2003.
- 36. Merkofer, M.; Kissner, R.; Hider, R. C.; Brunk, U. T. and Koppenol, W. H. "Fenton chemistry and iron chelation under physiologically relevant conditions: Electrochemistry and kinetics". *Chem Res Toxicol*. 19: 1263-1269, 2006.
- 37. Pucheu, S.; Coudray, C.; Tresallet, N.; Favier, A. and de Leiris, J. "Effect of iron overload in the isolated ischemic and reperfused rat heart". *Cardiovasc Drugs Ther*. 7: 701-711, 1993.
- 38. Tang, W. H.; Wu, S.; Wong, T. M.; Chung, S. K. and Chung, S. S. M. "Polyol pathway mediates iron-induced oxidative injury in ischemic-reperfused rat heart". *Free Radic Biol Med*. 45: 602-610, 2008.
- 39. Munoz, J. P.; Chiong, M.; García, L.; Troncoso, R.; Toro, B.; Pedrozo, Z.; Diaz-Elizondo, J.; Salas, D.; Parra, V.; Núñez, M. T.; Hidalgo, C. and Lavandero, S. "Iron induces protection and necrosis in cultured cardiomyocytes: Role of reactive oxygen species and nitric oxide". *Free Radic Biol Med*. 48: 526-534, 2010.

- 40. Zhang, W.; Han, Y.; Meng, G.; Bai, W.; Xie, L.; Lu, H.; Shao, Y.; Wei, L.; Pan, S.; Zhou, S.; Chen, Q.; Ferro, A. and Ji, Y. "Direct renin inhibition with aliskiren protects against myocardial ischemia reperfusion injury by activating nitric oxide synthase signaling in spontaneously hypertensive rats". *J Am Heart Assoc.* 28: 3:e000606, 2014.
- 41. Ambrosio, G.; Zweier, J. L.; Jacobus, W. E.; Weisfeldt, M. L. and Flaherty, J. T. "Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury". *Circulation.* 76: 906–915, 1987.
- 42. Paraskevaïdis, I. A.; Iliodromitis, E. K.; Vlahakos, D.; Tsiapras, D. P.; Nikolaidis, A.; Marathias, A.; Michalis, A. and Kremastinos, D. T. "Deferoxamine infusion during coronary artery bypass grafting ameliorates lipid peroxidation and protects the myocardium against reperfusion injury: immediate and long-term significance". *Eur Heart J.* 26: 263–270, 2005.
- 43. Zurlo, M. G.; De Stefano, P.; Borgna-Pignatti, C.; Di Palma, A.; Piga, A.; Melevendi, C.; Di Gregorio, F.; Burattini, M. G. and Terzoli, S. "Survival and causes of death in thalassaemia major". *Lancet.* 2: 27–30, 1989.
- 44. Xia, S.; Zhang, W.; Huang, L. and Jiang, H. "Comparative efficacy and safety of deferoxamine, deferiprone and deferasirox on severe thalassemia: a meta-analysis of 16 randomized controlled trials". *PLoS One.* 23: 82662, 2013.
- 45. Hoffbrand, A. V.; Taher, A. and Cappellini, M. D. "How I treat transfusional iron overload". *Blood.* 120: 3657-3669, 2012.
- 46. Heusch, G. "Critical Issues for the Translation of Cardioprotection". *Circ Res.* 120:1477-1486, 2017.
- 47. Hausenloy, D. and Yellon, D. "Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target". *J Clin Invest.* 123: 92-100, 2013.
- 48. Dhalla, N. S.; Elmoselhi, A. B.; Hata, T. and Makino, N. "Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury". *Cardiovasc Res.* 47: 446-456, 2000.
- 49. Ibáñez, B.; Heusch, G.; Ovize, M. and Van de Werf, F. "Evolving Therapies for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury". *J Am Coll Cardiol.* 65: 1454-1471, 2015.

- 50. Cung, T. T.; Morel, O.; Cayla, G.; Rioufol, G.; Garcia-Dorado, D.; Angoulvant, D.; Bonnefoy-Cudraz, E.; Guérin, P.; Elbaz, M.; Delarche, N.; Coste, P.; Vanzetto, G.; Metge, M.; Aupetit, J. F.; Jouve, B.; Motreff, P.; Tron, C.; Labeque, J. N.; Steg, P. G.; Cottin, Y.; Range, G.; Clerc, J.; Claeys, M. J.; Coussement, P.; Prunier, F.; Moulin, F.; Roth, O.; Belle, L.; Dubois, P.; Barragan, P.; Gilard, M.; Piot, C.; Colin, P.; De Poli, F.; Morice, M. C.; Ider, O.; Dubois-Randé, J. L.; Untersee, T.; Le Breton, H.; Béard, T.; Blanchard, D.; Grollier, G.; Malquarti, V.; Staat, P.; Sudre, A.; Elmer, E.; Hansson, M. J.; Bergerot, C.; Boussaha, I.; Jossan, C.; Derumeaux, G.; Mewton, N. and Ovize, M. "Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction". *N Engl J Med.* 373: 1021-1031, 2015.
- 51. Atar, D.; Arheden, H.; Berdeaux, A.; Bonnet, J. L.; Carlsson, M.; Clemmensen, P.; Cuvier, V.; Danchin, N.; Dubois-Randé, J. L.; Engblom, H.; Erlinge, D.; Firat, H.; Halvorsen, S.; Hansen, H. S.; Hauke, W.; Heiberg, E.; Koul, S.; Larsen, A. I.; Le Corvoisier, P.; Nordrehaug, J. E.; Paganelli, F.; Pruss, R. M.; Rousseau, H.; Schaller, S.; Sonou, G.; Tuseth, V.; Veys, J.; Vicaut, E. and Jensen, S. E. "Effect of intravenous TRO40303 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction: MITOCARE study results". *Eur Heart J.* 36: 112-119, 2015.
- 52. Selker, H. P.; Beshansky, J. R.; Sheehan, P. R.; Massaro, J. M.; Griffith, J. L.; D'Agostino, R. B.; Ruthazer, R.; Atkins, J. M.; Sayah, A. J.; Levy, M. K.; Richards, M. E.; Aufderheide, T. P.; Braude, D. A.; Pirralo, R. G.; Doyle, D. D.; Frascone, R. J.; Kosiak, D. J.; Leaming, J. M.; Van Gelder, C. M.; Walter, G. P.; Wayne, M. A.; Woolard, R. H.; Opie, L. H.; Rackley, C. E.; Apstein, C. S. and Udelson, J. E. "Out-of-hospital administration of intravenous glucose-insulin-potassium in patients with suspected acute coronary syndromes: the IMMEDIATE randomized controlled trial". *JAMA.* 307: 1925-1933, 2012.
- 53. Ott, I.; Schulz, S.; Mehilli, J.; Fichtner, S.; Hadamitzky, M.; Hoppe, K.; Ibrahim, T.; Martinoff, S.; Massberg, S.; Laugwitz, K. L.; Dirschinger, J.; Schwaiger, M.; Kastrati, A. and Schmig, A. "REVIVAL-3 Study Investigators. Erythropoietin in Patients With Acute ST-Segment Elevation Myocardial

- Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention". *Circ Cardiovasc Interv.* 3: 408-413, 2010.
- 54. Venugopal, V.; Hausenloy, D. J.; Ludman, A.; Di Salvo, C.; Kolvekar, S.; Yap, J.; Lawrence, D.; Bognolo, J. and Yellon, D. M. "Remote ischaemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery with cold-blood cardioplegia: a randomised controlled trial". *Heart.* 95: 1567-1571, 2009.
  - 55. Hausenloy, D. J.; Candilio, L.; Evans, R.; Ariti, C.; Jenkins, D. P.; Kolvekar, S.; Knight, R.; Kunst, G.; Laing, C.; Nicholas, J. M.; Pepper, J.; Robertson, S.; Xenou, M.; Clayton, T. and Yellon, D. M. "Effect of Remote Ischaemic preconditioning on Clinical outcomes in patients undergoing Coronary Artery bypass graft surgery (ERICCA study): a multicentre doubleblind randomised controlled clinical trial". Southampton (UK): NIHR Journals Library. Trial registration: ClinicalTrials.gov NCT01247545, 2016.
  - 56. García-Dorado, D. COMBinAtion Therapy in Myocardial Infarction: The COMBAT-MI Trial (COMBAT-MI). Trial registration: ClinicalTrials.gov NCT02404376. Sponsor: Hospital Universitari Vall d'Hebron Research Institute.
  - 57. Pasupathy, S.; Tavella, R.; Grover, S.; Raman, B.; Procter, N. E. K.; Du, Y. T.; Mahadavan, G.; Stafford, I.; Heresztyn, T.; Holmes, A.; Zeitz, C.; Arstall, M.; Selvanayagam, J.; Horowitz, J. D. and Beltrame, J. F. "Early Use of N-acetylcysteine With Nitrate Therapy in Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention for ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Reduces Myocardial Infarct Size (the NACIAM Trial [N-acetylcysteine in Acute Myocardial Infarction])". *Circulation.* 136: 894-903, 2017.
  - 58. González-Montero, J.; Brito, R.; Gajardo, A. I. J. and Rodrigo, R. "Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities". *World J Cardiol.* 10:74-86, 2018.
  - 59. Heller, R.; Werner-Felmayer, G. and Werner, E. R. "α-Tocopherol and Endothelial Nitric Oxide Synthesis". *Ann N Y Acad Sci.* 1031:74–85, 2004.
  - 60. Heller, R.; Werner-Felmayer, G. and Werner, E. R. "Antioxidants and endothelial nitric oxide synthesis". *Eur J Clin Pharmacol.* 62: 21-28, 2006.

- 61. Gille, L.; Staniek, K. and Nohl, H. "Effects of tocopheryl quinone on the heart: model experiments with xanthine oxidase, heart mitochondria, and isolated perfused rat hearts". *Free Radic Biol Med.* 30: 865-876, 2001.
- 62. Ramlawi, B.; Otu, H.; Mieno, S.; Boodhwani, M.; Sodha, N. R.; Clements, R. T.; Bianchi, C. and Sellke, F. W. "Oxidative Stress and Atrial Fibrillation After Cardiac Surgery: A Case- Control Study". *Ann Thorac Surg.* 84: 1166-1173, 2007.
- 63. Newaz, M. A.; Yousefipour, Z. and Nawal, N. N. A. "Modulation of nitric oxide synthase activity in brain, liver, and blood vessels of spontaneously hypertensive rats by ascorbic acid: protection from free radical injury". *Clin Exp Hypertens.* 27:497-508, 2005.
- 64. Guney, M.; Oral, B.; Demirin, H.; Karahan, N.; Mungan, T. and Delibas, N. "Protective effects of vitamins C and E against endometrial damage and oxidative stress in fluoride intoxication". *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34:467-474, 2007.
- 65. Chatterjee, M.; Saluja, R.; Kumar, V.; Jyoti, A.; Kumar Jain, G.; Kumar Barthwal, M. and Dikshit, M. "Ascorbate sustains neutrophil NOS expression, catalysis, and oxidative burst". *Free Radic Biol Med.* 45: 1084-1093, 2008.
- 66. Schramm, A.; Matusik, P.; Osmenda, G. and Guzik, T. J. "Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology". *Vascul Pharmacol.* 56: 216-231, 2012.
- 67. Gille, L.; Gregor, W.; Staniek, K. and Nohl, H. "Redox-interaction of alpha-tocopheryl quinone with isolated mitochondrial cytochrome bc1 complex". *Biochem Pharmacol.* 68: 373-381, 2004.
- 68. Ulker, S.; McKeown, P. P. and Bayraktutan, U. "Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities". *Hypertens.* 41: 534-539, 2003.
- 69. Wu, F.; Schuster, D. P.; Tyml, K. and Wilson, J. X. "Ascorbate inhibits NADPH oxidase subunit p47phox expression in microvascular endothelial cells". *Free Radic Biol Med.* 42: 124-131, 2007.

- 70. May, J. M.; Qu, Z. and Mendiratta, S. "Protection and Recycling of  $\alpha$ -Tocopherol in Human Erythrocytes by Intracellular Ascorbic Acid". *Arch Biochem Biophys.* 15: 281-289, 1998.
- 71. Taddei, S.; Viridis, A.; Ghiadoni, L. and Salvetti, A. "Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fancy?" *J Cardiovasc Pharmacol.* 32:41-47, 1998.
- 72. Newaz, M. A.; Nawal, N. N.; Rohaizan, C. H.; Muslim, N. and Gapor, A. "Alpha-Tocopherol increased nitric oxide synthase activity in blood vessels of spontaneously hypertensive rats". *Am J Hypertens.* 12: 839-844, 1999.
- 73. Gao, F.; Yao, C. L.; Gao, E.; Mo, Q. Z.; Yan, W. L.; McLaughlin, R.; Lopez, B. L.; Christopher, T. A. and Ma, X. L. "Enhancement of glutathione cardioprotection by ascorbic acid in myocardial reperfusion injury". *J Pharmacol Exp Ther.* 301: 543-550, 2002.
- 74. Levine, M.; Padayatty, S. J. and Espey, M. G. "Vitamin C: A Concentration-Function Approach Yields Pharmacology and Therapeutic Discoveries". *Adv Nutr.* 2:78-88, 2011.
- 75. Schneider, M.; Delles, C.; Schmidt, B.; Oehmer, S.; Schwarz, T.; Schmieder, R. and John, S. "Superoxide scavenging effects of acetylcysteine and vitamin C in subjects with essential hypertension". *Am J Hypertens.* 18: 1111-1117, 2005.
- 76. Jackson, T. S.; Xu, A.; Vita, J. A. and Keaney, J. F. Jr. "Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations". *Circ Res.* 83: 916-922, 1998.
- 77. Padayatty, S. J.; Sun, A. Y.; Chen, Q.; Espey, M. G.; Drisko, J. and Levine, M. "Vitamin C: intravenous use by complementary and alternative medicine practitioners and adverse effects". *PLoS One.* 5: 11414, 2010.
- 78. Riordan, N. H.; Riordan, H. D. and Casciari, J. P. "Clinical and experimental experiences with intravenous vitamin C". *J Orthomolec Med.* 15: 201-213, 2000.
- 79. Peng, Y. W.; Buller, C. L. and Charpie, J. R. "Impact of N-acetylcysteine on neonatal cardiomyocyte ischemia-reperfusion injury". *Pediatr Res.* 70: 61-66, 2011.



- 80. Rushworth, G. F. and Megson, I. L. "Existing and potential therapeutic uses for N- acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits". *Pharmacol Ther.* 141:150-159, 2014.
- 81. Winterbourn, C. C. and Metodiewa, D. "Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide". *Free Radic Biol Med.* 27: 322-328, 1999.
- 82. Arstall, M. A.; Yang, J.; Stafford, I.; Betts, W. H. and Horowitz, J. D. "N-acetylcysteine in combination with nitroglycerin and streptokinase for the treatment of evolving acute myocardial infarction. Safety and biochemical effects". *Circulation.* 92: 2855-2862, 1995.
- 83. Yesilbursa, D.; Serdar, A.; Senturk, T.; Serdar, Z.; Sağ, S. and Cordan, J. "Effect of N- acetylcysteine on oxidative stress and ventricular function in patients with myocardial infarction". *Heart Vessels.* 21: 33-37, 2006.
- 84. Thiele, H.; Hildebrand, L.; Schirdewahn, C.; Eitel, I.; Adams, V.; Fuernau, G.; Erbs, S.; Linke, A.; Diederich, K. W.; Nowak, M.; Desch, S.; Gutberlet, M. and Schuler, G. "Impact of high-dose N-acetylcysteine versus placebo on contrast-induced nephropathy and myocardial reperfusion injury in unselected patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention". *J Am Coll Cardiol.* 55: 2201-2209, 2010.
- 85. Williams, R. E.; Zweier, J. L. and Flaherty, J. T. Treatment with deferoxamine during ischemia improves functional and metabolic recovery and reduces reperfusion-induced oxygen radical generation in rabbit hearts. *Circulation.* 83: 1006-1014, 1991.
- 86. Kolnagou, A.; Kleanthous, M. and Kontoghiorghes, G. J. "Reduction of body iron stores to normal range levels in thalassaemia by using a deferiprone/ deferoxamine combination and their maintenance thereafter by deferiprone monotherapy". *Eur J Haematol.* 85:430-438, 2010.
- 87. Freeman, A. P.; Giles, R. W.; Berdoukas, V. A.; Walsh, W. F.; Choy, D. and Murray, P. C. "Early left ventricular dysfunction and chelation therapy in thalassemia major". *Ann Intern Med.* 99:450-454, 1983.

- 88. Reddy, B. R.; Kloner, R. A. and Przyklenk, K. "Early treatment with deferoxamine limits myocardial ischemic/reperfusion injury". *Free Radic Biol Med.* 7:45-52, 1989.
- 89. Lesnefsky, E. J.; Repine, J. E. and Horwitz, L. D. "Deferoxamine pretreatment reduces canine infarct size and oxidative injury". *J Pharmacol Exp Ther.* 253: 1103-1109, 1990.
- 90. Karahaliou, A.; Katsouras, C.; Koulouras, V.; Nikas, D.; Niokou, D.; Papadopoulos, G.; Nakos, G.; Sideris, D. and Michalis, L. "Ventricular arrhythmias and antioxidative medication: experimental study". *Hellenic J Cardiol.* 49: 320-328, 2008.
- 91. Chan, W.; Taylor, A. J.; Ellims, A. H.; Lefkovits, L.; Wong, C.; Kingwell, B. A.; Natoli, A.; Croft, K. D.; Mori, T.; Kaye, D. M.; Dart, A. M. and Duffy, S. J. "Effect of iron chelation on myocardial infarct size and oxidative stress in ST-elevation-myocardial infarction". *Circ Cardiovasc Interv.* 5: 270-278, 2012.
- 92. Podmore, I. D.; Griffiths, H. R.; Herbert, K. E.; Mistry, N.; Mistry, P. and Lunec, J. "Vitamin C exhibits pro-oxidant properties". *Nature.* 392: 6676, 1998.
- 93. Berger, T. M.; Polidori, M. C.; Dabbagh, A.; Evans, P. J.; Halliwell, B.; Morrow, J. D.; Roberts, L. J. 2nd. and Frei, B. "Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma". *J Biol Chem.* 272: 15656-15660, 1997.
- 94. Vethanayagam, J. G.; Green, E. H.; Rose, R. C. and Bode, A. M. "Glutathione-dependent ascorbate recycling activity of rat serum albumin". *Free Radic Biol Med.* 26: 1591-1598, 1999.
- 95. Xia, Z.; Guo, Z.; Nagareddy, P. R.; Yuen, V.; Yeung, E. and McNeill, J. H. Antioxidant N-acetylcysteine restores myocardial Mn-SOD activity and attenuates myocardial dysfunction in diabetics rats. *Eur J Pharmacol.* 544:118-125, 2006.
- 96. Meyer, M.; Bell, S. P.; Chen, Z.; Nyotowidjojo, I.; Lachapelle, R. R.; Christian, T. F.; Gibson, P. C.; Keating, F. F.; Dauerman, H. L. and LeWinter, M. M. "High dose intracoronary N-acetylcysteine in a porcine model of ST elevation myocardial infarction". *J Thromb Thrombolysis.* 36: 433-441, 2013.

- 97. Abe, M.; Takiguchi, Y.; Ichimaru, S.; Tsuchiya, K. and Wada, K. "Comparison of the protective effect of Nacetylcysteine by different treatments on rat myocardial ischemia-reperfusion injury". *J Pharmacol Sci.* 106: 571-577, 2008.
- 98. Porter, J. B.; Abeysinghe, R. D.; Marshall, L.; Hider, R. C. and Singh, S. "Kinetics of removal and reappearance of non-transferrin-bound plasma iron with deferoxamine therapy". *Blood.* 88: 705-713, 1996.
- 99. Lesnefsky, E.; Repine, J. and Horwitz, L. "Deferoxamine pretreatment reduces canine infarct size and oxidative injury". *J Pharmacol Exp Ther.* 253: 1103-1109, 1990.
- 100. Kim, H. W.; Farzaneh-Far, A. and Kim, R. J. "Cardiovascular magnetic resonance in patients with myocardial infarction". *J Am Coll Cardiol.* 55: 1-16, 2009.
- 101. Masci, P. G. and Bogaert, J. "Post myocardial infarction of the left ventricle: the course ahead seen by cardiac MRI". *Cardiovasc Diagn Ther.* 2: 113-127, 2012.
- 102. Nijveldt, R.; Beek, A. M.; Hirsch, A.; Stoel, M. G.; Hofman, M. B.; Umans, V. A.; Algra, P. R.; Twisk, J. W. and van Rossum, A. C. "Functional recovery after acute myocardial infarction: comparison between angiography, electrocardiography, and cardiovascular magnetic resonance measures of microvascular injury". *J Am Coll Cardiol.* 52: 181-189, 2008.
- 103. Niccoli, G.; Scalone, G.; Lerman, A. and Crea, F. "Coronary microvascular obstruction in acute myocardial infarction". *Eur Heart J.* 37: 1024-1033, 2016.
- 104. Bell, R. M.; Mocanu, M. M. and Yellon, D. M. "Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolate heart perfusion". *J Mol Cell Cardiol.* 50: 940-950, 2011.
- 105. Kim, H. W.; Farzaneh-Far, A. and Kim, R. J. "Cardiovascular magnetic resonance in patients with myocardial infarction - current and emerging applications". *J Am Coll Cardiol.* 55: 1-16, 2010.
- 106. Cerda, J. and Villarroel, L. "Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa". *Rev Chil Pediatr.* 79: 54-58, 2008.

- 107. Collins, C. E.; Quaggiotto, P.; Wood, L.; O'Loughlin, E. V.; Henry, R. L. and Garg, M. L. "Elevated plasma levels of F2 alpha isoprostane in cystic fibrosis". *Lipids*. 34: 551-556, 1999.
- 108. Hissin, P. J. and Hilf, R. "A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues". *Anal Biochem*. 74: 214-226, 1976.
- 109. Benzie, I. F. and Strain, J. J. "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay". *Anal Biochem*. 239: 70-76, 1996.
- 110. Chung, W. Y.; Chung, J. K.; Szeto, Y. T.; Tomlinson, B. and Benzie, I. F. "Plasma ascorbic acid: measurement, stability and clinical utility revisited". *Clin Biochem*. 34: 623-627, 2001.
- 111. Appleby, M. A.; Angeja, B. G.; Dauterman, K. and Gibson, C. M. "Angiographic assessment of myocardial perfusion: TIMI myocardial perfusion (TMP) grading system". *Heart*. 86: 485-486, 2001.
- 112. Gibson, C. M.; Cannon, C. P.; Daley, W. L.; Dodge, J. T. Jr.; Alexander, B. Jr.; Marble, S. J.; McCabe, C. H.; Raymond, L.; Fortin, T.; Poole, W. K. and Braunwald, E. "TIMI frame count: a quantitative method of assessing coronary artery flow". *Circulation*. 93: 879-888, 1996.
- 113. Griffith, O. W. "Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine". *Anal Biochem*. 106: 207-212, 1980.
- 114. Beckman, J. S. and Koppenol, W. H. "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly". *Am J Physiol*. 271: 1424-1437, 1996.
- 115. Brandt, P. W.; Partridge, J. B. and Wattie, W. J. "Coronary arteriography; method of presentation of the arteriogram report and a scoring system". *Clin Radiol*. 28: 361-365, 1977.
- 116. Moral, S.; Rodríguez-Palomares, J. F.; Descalzo, M.; Martí, G.; Pineda, V. and Otaegui, I. "Quantification of myocardial area at risk: validation of coronary angiographic scores with cardiovascular magnetic resonance methods". *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 65: 1010-1017, 2012.
- 117. Basili, S.; Tanzilli, G.; Mangieri, E.; Raparelli, V.; Di Santo, S.; Pignatelli, P. and Violi, F. "Intravenous ascorbic acid infusion improves myocardial perfusion

- grade during elective percutaneous coronary intervention: relationship with oxidative stress markers". *JACC Cardiovasc Interv.* 3: 221-229, 2010.
- 118. Wang, Z. J.; Hu, W. K.; Liu, Y. Y.; Shi, D. M.; Cheng, W. J.; Guo, Y. H.; Yang, Q.; Zhao, Y. X. and Zhou, Y. J. "The effect of intravenous vitamin C infusion on periprocedural myocardial injury for patients undergoing elective percutaneous coronary intervention". *Can J Cardiol.* 30: 96-101, 2014.
  - 119. Graumlich, J. F.; Ludden, T. M.; Conry-Cantilena, C.; Cantilena, L. R. Jr.; Wang, Y. and Levine, M. "Pharmacokinetic model of ascorbic acid in healthy male volunteers during depletion and repletion". *Pharm Res.* 14: 1133-1139, 1997.
  - 120. Nienhuis, A. W. "Vitamin C and iron". *N Engl J Med.* 304: 170-171, 1981.
  - 121. Gibson, C. M.; Cannon, C. P.; Murphy, S. A.; Marble, S. J.; Barron, H. V. and Braunwald, E. "TIMI Study Group. Relationship of the TIMI myocardial perfusion grades, flow grades, frame count, and percutaneous coronary intervention to long-term outcomes after thrombolytic administration in acute myocardial infarction". *Circulation.* 105: 1909-1913, 2002.
  - 122. Yoon, H. J.; Kim, K. H.; Kim, J. Y.; Cho, J. Y.; Yoon, N. S.; Park, H. W.; Hong, Y. J.; Kim, J. H.; Ahn, Y.; Jeong, M. H.; Cho, J. G. and Park, J. C. "Impaired diastolic recovery after acute myocardial infarction as a predictor of adverse events". *J Cardiovasc Ultrasound.* 23: 150-157, 2015.
  - 123. Badylak, S. F.; Simmons, A.; Turek, J. and Babbs, C. F. "Protection from reperfusion injury in the isolated rat heart by postischemic deferoxamine and oxypurinol administration". *Cardiovasc Res.* 21: 500-506, 1987.
  - 124. Kato, S.; Toyama, J.; Kodama, I.; Akita, T. and Abe, T. "Deferoxamine, an iron chelator, reduces myocardial injury and free radical generation in isolated neonatal rabbit hearts subjected to global ischemia-reperfusion". *J Mol Cell Cardiol.* 24: 1267-1275, 1992.
  - 125. Nikas, D. N.; Chatziathanasiou, G.; Kotsia, A.; Papamichael, N.; Thomas, C.; Papafaklis, M.; Naka, K. K.; Kazakos, N.; Milionis, H. J.; Vakalis, K.; Katsouras, C. S.; Mpoumpa, V.; Vougiouklakis, T. and Michalis, L. "Effect of intravenous administration of antioxidants alone and in combination on

- myocardial reperfusion injury in an experimental pig model". *Curr Ther Res Clin Exp.* 69: 423-439, 2008.
- 126. Crompton, M. and Costi, A. "A heart mitochondrial Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent pore of possible relevance to reperfusion-induced injury: evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states". *Biochem J.* 266: 33-39, 1990.
  - 127. Griffiths, E. J. and Halestrap, A. P. "Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion". *Biochem J.* 307: 93-98, 1995.
  - 128. Baines, C. P.; Kaiser, R. A.; Purcell, N. H.; Blair, N. S.; Osinska, H.; Hambleton, M. A.; Brunskill, E. W.; Sayen, M. R.; Gottlieb, R. A.; Dorn, G. W.; Robbins, J. and Molkenkin, J. D. "Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death". *Nature.* 434: 658-662, 2005.
  - 129. Nakagawa, T.; Shimizu, S.; Watanabe, T.; Yamaguchi, O.; Otsu, K.; Yamagata, H.; Inohara, H.; Kubo, T. and Tsujimoto Y. "Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death". *Nature.* 434: 652-658, 2005.
  - 130. Duchon, M. R.; McGuinness, O.; Brown, L. A. and Crompton, M. "On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury". *Cardiovasc Res.* 27: 1790-1794, 1993.
  - 131. Tsai, M. S.; Huang, C. H.; Tsai, C. Y.; Chen, H. W.; Lee, H. C.; Cheng, H. J.; Hsu, C. Y.; Wang, T. D.; Chang, W. T. and Chen, W. J. "Ascorbic acid mitigates the myocardial injury after cardiac arrest and electrical shock". *Intensive Care Med.* 37: 2033-2040, 2011.
  - 132. Wang, T.; Mao, X.; Li, H.; Qiao, S.; Xu, A.; Wang, J.; Lei, S.; Liu, Z.; Ng, K. F.; Wong, G. T.; Vanhoutte, P. M.; Irwin, M. G. and Xia, Z. "N-Acetylcysteine and allopurinol up-regulated the JAK/STAT3 and PI3K/Akt pathways via adiponectin and attenuated myocardial postischemic injury in diabetes". *Free Radical Biology and Medicine.* 63: 291-303, 2013.

- 133. Mao, T. and Wang, Y. "N-acetylcysteine and allopurinol confer synergy in attenuating myocardial ischemia injury via restoring HIF-1 $\alpha$ /HO-1 signaling in diabetic rats". PLoS ONE. 8:e68949, 2013.
- 134. Lan, J. and Jiang, D. H. "Desferrioxamine and vitamin E protect against iron and MPTP-induced neurodegeneration in mice". J Neural Transm (Vienna). 104: 469-481, 1997.
- 135. Link, G.; Saada, A.; Pinson, A.; Konijn, A. M. and Hershko, C. "Mitochondrial respiratory enzymes are a major target of iron toxicity in rat heart cells". J Lab Clin Med. 131: 466-474, 1998.
- 136. Link, G.; Konijn, A. M. and Hershko, C. "Cardioprotective effect of alpha-tocopherol, ascorbate, deferoxamine, and deferiprone: mitochondrial function in cultured, iron-loaded heart cells". J Lab Clin Med. 133: 179-188, 1999.
- 137. Alta, R. Y.; Vitorino, H. A.; Goswami, D.; Liria, C. W.; Wisnovsky, S. P.; Kelley, S. O.; Machini, M. T. and Espósito, B. P. "Mitochondria penetrating peptides conjugated to desferrioxamine as chelators for mitochondrial labile iron". PLoS One. 12:e0171729, 2017.
- 138. Chang, H. C.; Wu, R.; Shang, M.; Sato, T.; Chen, C.; Shapiro, J. S.; Liu, T.; Thakur, A.; Sawicki, K. T.; Prasad, S. V. and Ardehali, H. "Reduction in mitochondrial iron alleviates cardiac damage during injury". EMBO Mol Med. 8: 247-267, 2016.

# ANEXO 1



Universidad de Chile

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

### **“PREVENCIÓN DEL DAÑO POR REPERFUSIÓN EN PACIENTES CON INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO TRATADOS CON ANGIOPLASTÍA CORONARIA”**

Nombre del Investigador Principal: **Dr. Ramón Rodrigo Salinas**

Institución: Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Nombre de los co-investigadores médicos: **Dr. Rubén Aguayo Nayle**  
**Dr. Angel Puentes Rico**

Instituciones participantes:

- **Departamento de Cardiología, Unidad de Hemodinamia, Hospital San Juan de Dios**
- **Departamento de Cardiología, Hospital Clínico San Borja-Arriarán**
- **Departamento Cardiovascular, Hospital Clínico Universidad de Chile**

**Invitación a participar:** Le estamos invitando a participar en un proyecto de investigación para prevenir las complicaciones producidas por un infarto agudo de miocardio, que consiste en la falla de una parte del músculo de su corazón que le puede producir a futuro dificultades en su capacidad funcional (hacer sus actividades diarias). El presente estudio propone la aplicación de un tratamiento simple, por vía endovenosa (vitaminas C y E) desde este momento y hasta 3 horas posteriores a la angioplastia (procedimiento que busca abrir la arteria tapada), y posteriormente por vía oral hasta el segundo control de su corazón mediante resonancia magnética cardíaca. Con este tratamiento se podría evitar que se produzcan alteraciones en su corazón que pueden disminuir su capacidad de hacer labores diarias. Se trata de un estudio experimental en que Ud. podría recibir, en forma aleatoria, ya sea las vitaminas o bien placebo, que es el vehículo de la solución inyectable pero que no contiene las vitaminas.

**Objetivos:** Esta investigación tiene por objetivos evaluar la eficacia de las vitaminas C y E como medida para disminuir el tamaño del infarto en pacientes sometidos a angioplastia coronaria. El estudio se realizará en el Departamento de Cardiología, Unidad de Hemodinamia del Hospital San Juan de Dios con un número total de 134 pacientes durante los años 2012 al 2016.

**Procedimientos:** Si Ud. se debe someter a una angioplastia primaria percutánea (primer procedimiento para abrir la arteria ocluida durante el infarto) y está de acuerdo en participar en el proyecto, usted será sometido a los siguientes procedimientos: (1) los procedimientos habituales que le han sido explicados por su médico tratante, (2) los procedimientos propios del estudio. Para estos últimos, antes de realizar la angioplastia Ud. deberá aceptar su



## ANEXO 1

participación mediante la firma de este Consentimiento. Posteriormente se le asignará, al azar, uno de los tratamientos en estudio y se le tomará una muestra de sangre antes de la angioplastia (muestra basal o inicial), otra inmediatamente después de recanalizar la arteria y otra durante las primeras 6-8 horas después del procedimiento, la cual también será utilizada para identificar las enzimas que son liberadas de la parte dañada del corazón. Por lo tanto, se le extraerá sólo la sangre necesaria para tales determinaciones específicas. Finalmente la cuarta muestra será tomada antes del alta hospitalaria. A los 6 y 84 días posteriores al procedimiento se le medirá el tamaño del infarto y la función de su corazón por un método de resonancia magnética cardíaca, para ver cuánto de su corazón quedó dañado a pesar del tratamiento para abrir la arteria que estaba tapada y que le produjo el infarto. Este examen no perjudica a su organismo y nos permite marcar la zona con menos función de su músculo cardíaco, para así determinar el beneficio del tratamiento que le estamos administrando. Por otra parte, si Ud. está recibiendo placebo, las vitaminas no serán administradas, sino que preparaciones similares que no tienen el efecto de las vitaminas. Lo importante es que a pesar de no recibirlas, Ud. estará mejor monitorizado (a) vigilado por el equipo médico y técnico que lleva este protocolo; nosotros también registraremos su corazón por un tiempo más largo que el habitual para los pacientes que son tratados por un ataque cardíaco.

Con respecto al punto de las determinaciones bioquímicas, se obtendrán muestras de sangre de una punción cada vez, aproximadamente dos cucharaditas, las cuales se separarán en 2 fracciones de alrededor de 5 ml cada una, con y sin anticoagulante, respectivamente. Las muestras serán separadas por centrifugación en:

- Plasma: Para la determinación de la capacidad antioxidante, productos lipídicos y enzimas cardíacas.
- Glóbulos rojos: Para la medición de factores lipídicos y cantidad de un antioxidante llamado glutatión

Mientras Ud. se encuentre hospitalizado será visitado diariamente por el equipo y atendido por uno de los investigadores y la enfermera del proyecto; junto a ello se le practicará un registro de la frecuencia cardíaca

**Riesgos:** La administración de vitamina C y vitamina E durante un período breve y a las dosis usadas en el protocolo, en general, no tiene efectos colaterales; solamente se describen complicaciones en pacientes con falla renal o deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, los cuales no serán incorporados a este estudio. Cualquier efecto que Ud. crea que ha sido causado por el uso de estas sustancias debe notificarlo al equipo de investigadores o a la enfermera a cargo en la Unidad de Hemodinamia del Departamento de Cardiología del Hospital San Juan de Dios, o a los co-investigadores médicos responsables, el Dr. Rubén Aguayo Nayle, al teléfono 5741929, o al Dr. Angel Puentes Rico, al teléfono 5742017.

**Costos:** Las sustancias usadas en este estudio (vitamina C y vitamina E) serán proporcionadas por los investigadores sin costo para Ud. durante el desarrollo

## ANEXO 1

de este proyecto. Todos los exámenes o prestaciones que no sean necesarias para el estudio o tratamiento habitual de su enfermedad serán igualmente financiados por el proyecto.

**Beneficios:** Este estudio podría protegerlo a Ud. o a futuros pacientes de las consecuencias que un ataque cardíaco produce sobre la calidad de vida. También significará un beneficio para el avance del conocimiento y mejoría del tratamiento de esta enfermedad.

**Alternativas:** Si Ud. escoge no participar en esta investigación será sometido al estudio y tratamiento que se aplica habitualmente a los pacientes que tienen indicación de angioplastia primaria percutánea.

**Compensación:** Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de su participación en este estudio será mantenida en estricta confidencialidad. Los únicos que tendrán acceso al proyecto son los investigadores y/o supervisores de la investigación de la institución que financia el proyecto (FONDECYT). Cualquier publicación o comunicación de los resultados de la investigación serán completamente anónimas.

**Información adicional:** Ud. o su médico tratante serán informados si surgen, durante este estudio, desarrollo del conocimiento o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

**Voluntariedad:** Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento por Ud. o su médico tratante, notificando al investigador sin tener que explicar la decisión y aunque este estudio no cambie el tratamiento habitual de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esta decisión es en su beneficio.

**Complicaciones:** En el caso de la punción venosa para la recolección de las muestras de sangre pudiera causar algún inconveniente como dolor moderado, o moretón, es como ocurriría comúnmente con cualquiera punción para cualquier otro propósito durante la hospitalización y generalmente es rápidamente resuelta por la enfermera del proyecto. En el caso poco probable de que Ud. presente complicaciones directamente atribuidas a la administración de vitaminas C y/o E, Ud. recibirá el tratamiento médico completo de tales complicaciones, financiado por el proyecto, y sin costo alguno para Ud. o su sistema previsional. Esto no incluye las complicaciones propias de su enfermedad y de su curso natural. La vitamina E será administrada en la dosis habitual de 400 UI por día, para lo cual no se describen complicaciones. La vitamina C se administrará durante el procedimiento en altas dosis (54 g/ 3 horas), y podría dar lugar a la formación de cálculos renales en algunas personas que poseen alteraciones de la función de los riñones, por lo cual éstas se excluyen del estudio. La decisión del origen

## ANEXO 1

de sus complicaciones será determinada por un Comité de Seguridad formado por 2 cardiólogos externos al proyecto (Dres. Mauricio Cereceda Brantes y Hernán Prat Martorell, del Departamento Cardiovascular, Universidad de Chile, y Dr. Miguel Oyonarte Gómez del Centro Cardiovascular Hospital Clínico San Borja Arriaran).

**Término de participación en el estudio:** Su participación en este estudio es estrictamente voluntaria; no es requerido(a) participar. El hecho de rehusar su participación no le afectará en modo alguno. Si decide participar, Ud. debe firmar el formulario de consentimiento, para demostrar su determinación de hacerlo. Sin embargo, usted puede dejar el estudio en cualquier momento, sin ser tratado (a) en una forma diferente debido a esto. Para esto, por favor notifique a cualquier investigador médico del proyecto, como asimismo por cualquier consulta que desee realizar durante el curso del estudio:

Dr. Rubén Aguayo Nayle 2-5741929  
Dr. Angel Puentes Rico 2-5742017  
Dr. Germán Armijo Ortiz 8-9232546

Si usted está de acuerdo o no en participar en el estudio, marque alguna de las opciones abajo señaladas:

**Si acepto \_\_\_\_\_**

**No acepto \_\_\_\_\_**

**Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética Científico y de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y del Comité de Ética Central del SSMC. Cualquier consulta llamar a su Presidente al teléfono 9789008.**

## ANEXO 1

### Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, yo otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto **“PREVENCIÓN DEL DAÑO POR REPERFUSIÓN ASOCIADO CON LA ANGIOPLASTÍA CORONARIA PERCUTÁNEA EN PACIENTES QUE HAN SUFRIDO UN INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO”**

Nombre del participante:.....

RUT.....Firma.....Fecha.....

Nombre del testigo (si el estudio lo amerita)

.....

Nombre del Investigador o médico designado.....

.....

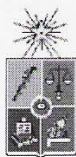
RUT.....Firma.....Fecha.....

Nombre del Delegado del Director o Ministro de Fe.....

.....

RUT.....Firma.....Fecha.....

## ANEXO 2



**UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE MEDICINA**  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

1/2

### ACTA DE APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS



Con fecha 19 de julio de 2011, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente  
Sra. Marianne Gaudlitz H., Enfermera, Mg. Humanidades, Vicepresidente  
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública  
Dr. Leandro Biagini A., Médico Internista  
Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista  
Sra. Nina Horwitz C., Sociólogo, Mg. Bioética  
Dra. María Eugenia Pinto C., Médico Infectólogo  
Sra. Claudia Marshall F., Representante de la comunidad

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"PREVENTION OF REPERFUSION DAMAGE ASSOCIATED WITH PERCUTANEOUS CORONARY ANGIOPLASTY FOLLOWING ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION"** y cuyo investigador responsable es el **Dr. Ramón Rodrigo S.**, quien desempeña funciones en el **Programa Disciplinario Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.**

*El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:*

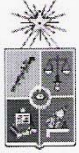
- *Proyecto de investigación in extenso*
- *Consentimiento informado*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

**Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: [ceiha@med.uchile.cl](mailto:ceiha@med.uchile.cl)**

## ANEXO 2

2/2



**UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE MEDICINA**  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



Sobre la base de esta información el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:


- a) **Carácter de la población estudiada:** Investigación terapéutica en 132 pacientes sometidos a angioplastia coronaria percutánea por infarto agudo del miocardio.
- b) **Utilidad del Proyecto:** Podría ser útil en evitar una mayor extensión del infarto del miocardio.
- c) **Riesgos y Beneficios:** La administración de megadosis de vitamina C y E en periodos breves no se ha demostrado tener efectos adversos.
- d) **Protección de los participantes:** La confidencialidad de los participantes y de sus datos esta garantizada por el Consentimiento Informado.
- e) **Notificación oportuna de reacciones adversas:** El investigador responsable se compromete a notificar al Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos si se observan efectos adversos con la administración de vitamina C y E en altas dosis post angioplastia.
- f) **El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto.**

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión corregida del 15 de Julio de 2011, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por el CEISH.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Santiago, 19 de julio de 2011.

  
**Sra. Marianne Gaudin H.**  
Vicepresidenta  
Comité de Ética en Investigación  
en Seres Humanos

MGH/mva.  
c.c.: Archivo Proy. 060-2011

**Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl**

## ANEXO 2

UNIVERSIDAD DE CHILE  
HOSPITAL CLINICO  
Comité Ética



HOSPITAL CLINICO UNIVERSIDAD DE CHILE



### ACTA DE APROBACION N° 53

SANTIAGO, Julio 27 del 2011.

El Comité Ético Científico para Investigación Biomédica (CECeI) en Seres Humanos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Juan Jorge Silva Solís. Médico Cirujano. Presidente.  
Dra. Ana María Madrid S. Médico Gastroenterólogo. Secretaria.  
Dr. Sergio Valenzuela P. Médico Ginecoobstetra. (no asiste).  
Dr. Javier Brahm B. Médico Gastroenterólogo.  
Dr. Juan Carlos Prieto D. Farmacología Clínica.  
Srta. Rina Sepúlveda A. Abogado.  
Dr. Guillermo Watkins S. Médico Cirujano.  
Dra. Gloria López Stewarts. Médico Endocrinólogo.  
Dr. Antonio Morales Barria. Médico Gastroenterólogo.  
Dra. Teresa Massardo Vega. Médico. Medicina Nuclear. (no asiste)  
Prof. Verónica Anguita Mackay. Académico. Facultad de Medicina. (no asiste).

Ha analizado el proyecto denominado: "Prevención del daño por reperfusión asociado con la angioplastia coronaria percutánea en pacientes que han sufrido un infarto agudo de miocardio", cuyo investigador principal es el **Dr. Ramón Rodrigo Salinas**, del ICBM. Facultad de Medicina Universidad de Chile.

Para este efecto tuvo a la vista los siguientes documentos:

- Solicitud de evaluación del proyecto de investigación por Comité de Ética.
- CV. del investigador principal.
- Resumen ejecutivo.
- Concurso Fondecyt 2011.
- Consentimiento Informado.
- Se adjunta nómina de los integrantes del Comité.
- Se adjunta Declaración de Cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas.

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de esta información el Comité Ético Científico para Investigación Biomédica en Seres Humanos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

**a) Carácter de la población estudiada:**

Se estudiará 132 pacientes cautivos (hospitalizados por infarto agudo al miocardio, primer episodio), de ambos sexos mayores de 18 años entre los años 2012 al 2015.

## ANEXO 2

UNIVERSIDAD DE CHILE  
HOSPITAL CLINICO  
Comité Ética



HOSPITAL CLINICO UNIVERSIDAD DE CHILE



**b) Utilidad del Proyecto:**

Evaluarán el uso de vitamina C y vitamina E como medida para mejorar la función del corazón disminuida por infarto.

**c) Riesgos:**

La administración de vitaminas C y E durante un período breve y a las dosis usadas en el estudio, no tiene efectos colaterales no deseados.

**d) Beneficios:**

Podría mejorar significativamente el pronóstico, reduciendo el tamaño del infarto, junto con preservar una importante fracción de la función cardíaca.

**e) Confidencialidad del estudio:**

Está asegurada en el Consentimiento informado que adjunta.

**f) Notificación oportuna de reacciones adversas:**

No debería haber inconvenientes ya que las vitaminas que se utilizarán han sido usadas por muchos años en seres humanos.

**g) El investigador responsable se compromete a comunicar el resultado del estudio y a publicarlo.**

Por lo tanto el Comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

El Comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado, que es adecuado y que se adjunta firmado, fechado y timbrado por el CECeI.

En virtud de las consideraciones anteriores, el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, con fecha **27 de Julio del 2011**.

Saluda atentamente a Usted,



**DR. JUAN JORGE SILVA SOLIS**

**PRESIDENTE  
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO  
HOSPITAL CLINICO U. DE CHILE**



## ANEXO 2



MINISTERIO DE SALUD  
SERVICIO DE SALUD M.  
CENTRAL

COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

Telefono: 5746943

CSS/jec N° 482/13

### CERTIFICADO

DR. EMILIANO SOTO ROMO, en calidad de Presidente del Comité Ético-Científico (CEC), del Servicio de Salud Metropolitano Central, constituido por resolución exenta N° 0187 de fecha 12 de mayo del 2006 de la Dirección de dicho Servicio, certifica que en sesión expedita de fecha 18 de Julio del 2013, el Comité de Ética acusa recibo de carta fechada el 15 de julio del 2013, y recibida el 18 de Julio del 2013 del **Dr. Javier Gárate Becado de Cardiología del HCSBA** cuyo Investigador Principal es el **Dr. Ramón Rodrigo** de la **Facultad de Medicina de la Universidad de Chile**, siendo Investigadores principales en el HCSBA los **Doctores Lucio León y Javier Gárate**, del Protocolo: **"Prevención del daño por repercusión en pacientes con Infarto Agudo de Miocardio tratados con angioplastia coronaria"** quién envía para revisión y aprobación el siguiente documento del protocolo de la referencia.

#### **Se acusa recibo del siguiente documento:**

Consentimiento Informado versión 1/1 de Junio del 2013, con modificaciones solicitadas por este CEC en certificado 468/13 de Reunión expedita del día 09/07/2013.

#### **Analizado el documento de la referencia este CEC-SSMC acuerda lo siguiente:**

#### **Aprueba:**

Consentimiento Informado versión 1 de Junio del 2013, documento de 05 hojas, se firma, se fecha y se timbra.


Se adjunta copia de carta enviada por el investigador, firmada, fechada y timbrada.

## ANEXO 2

Se deja constancia de las revisiones expeditas son realizadas por un numero menor de miembros del Comité, por lo tanto no existe hoja de asistencia a reunión y queda sentado en acta el nombre de los miembros del CEC, que realizaron la revisión.



**DR. EMILIANO SOTO ROMO**  
**PRESIDENTE CEC**  
**SERVICIO DE SALUD METROPOLITANO CENTRAL**



**E.U. CARMEN SALAZAR SALGADO**  
**SECRETARIA EJECUTIVA CEC**  
SANTIAGO, 18 de Julio 2013  
Dirección Servicio de Salud Metropolitano Central  
Victoria Subercaseaux #381, Santiago, Chile

## ANEXO 3



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

### CERTIFICACIÓN

El Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, certifica que en la tesis de Investigación titulada *“Prevención del daño miocárdico por reperfusión en infarto agudo de miocardio mediante la atenuación del estrés oxidativo”*, cuyo Investigador Responsable es el **Dr. Jaime González Montero** y su Patrocinante es el **Dr. Ramón Rodrigo Salinas** del Laboratorio de estrés oxidativo y nefrotoxicidad, ICBM, Facultad de Medicina, Programa Disciplinario de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones que contravengan las Normas Bioéticas Básicas de Manejo y Cuidados de los Animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (CBA 0795 FMUCH).

Ambos investigadores se han comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar modificación alguna sin previa notificación y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por **36** meses, tiempo estimado de ejecución correspondiente al Proyecto de Tesis Doctorado en Ciencias Médicas.

*El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por 13 miembros con experiencia en bioética asociada a experimentación animal: 3 veterinarios, 8 académicos de diversas disciplinas y 2 personas ajenas a la academia. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO” después de un estudio acucioso por sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.*

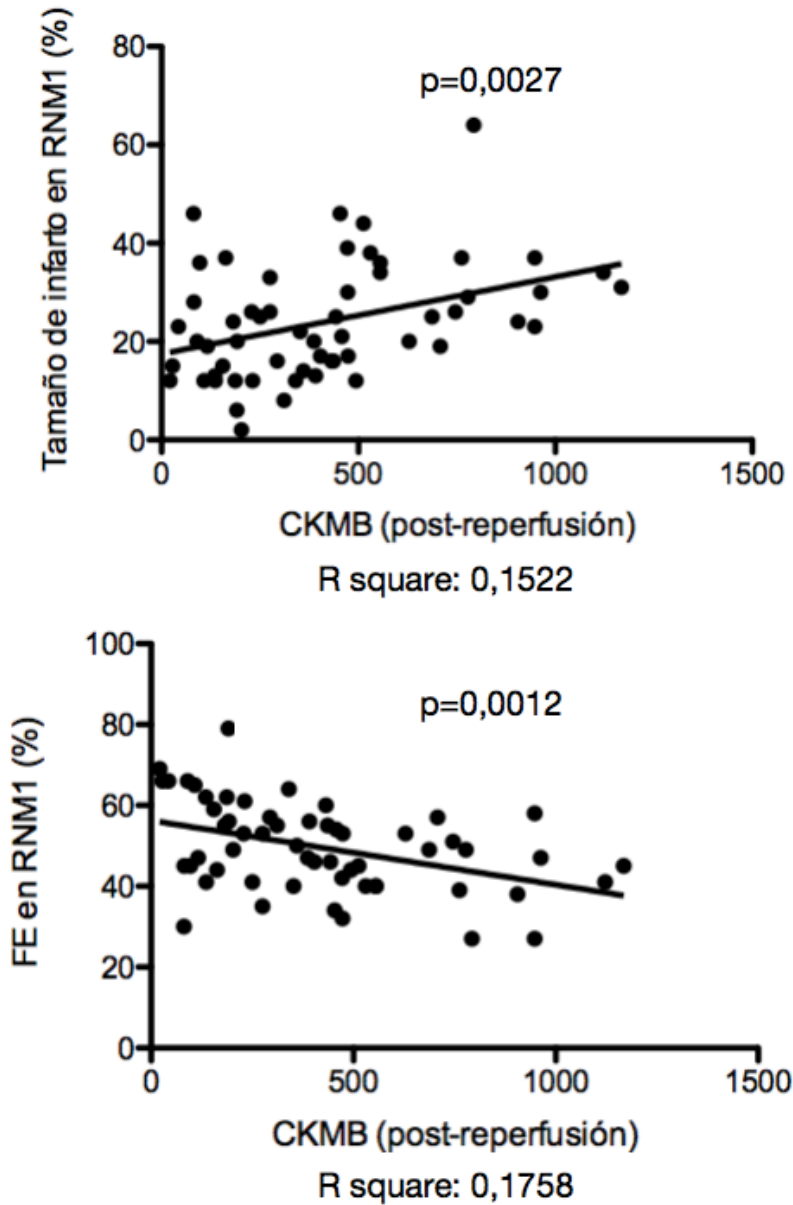
**Dr. Emilio Herrera Videla**  
Presidente

*Comité de Bioética sobre Investigación en Animales*



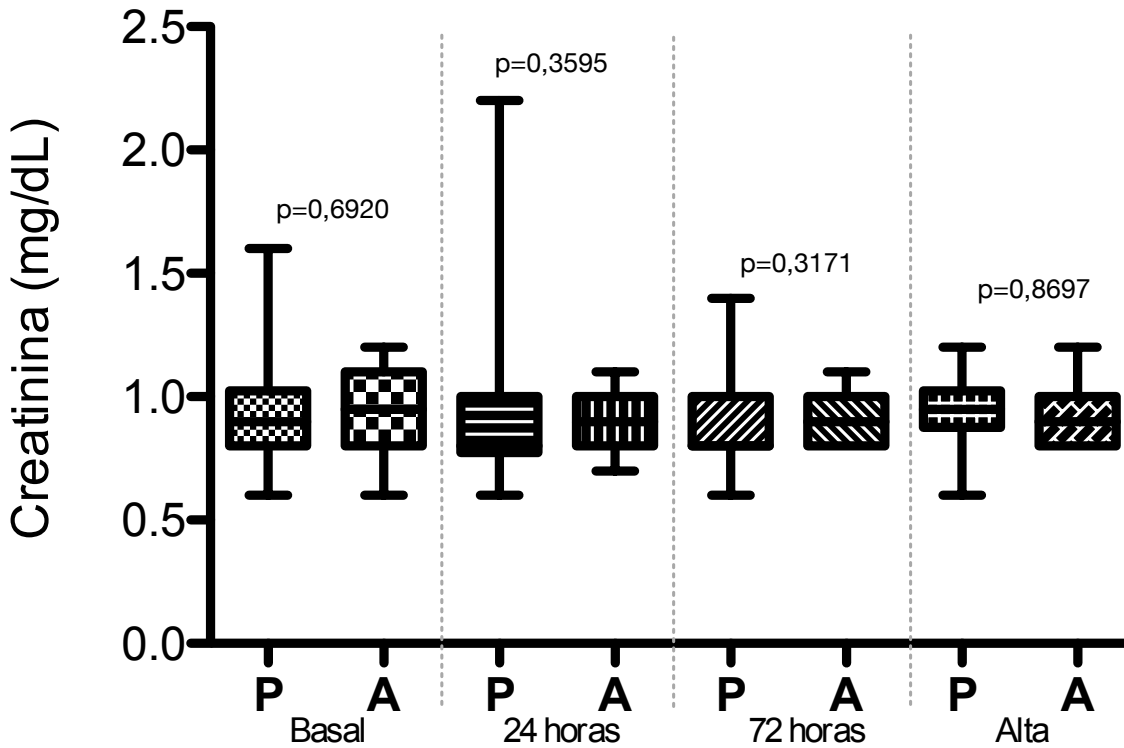
Santiago, 21 de agosto de 2015.

## ANEXO 4



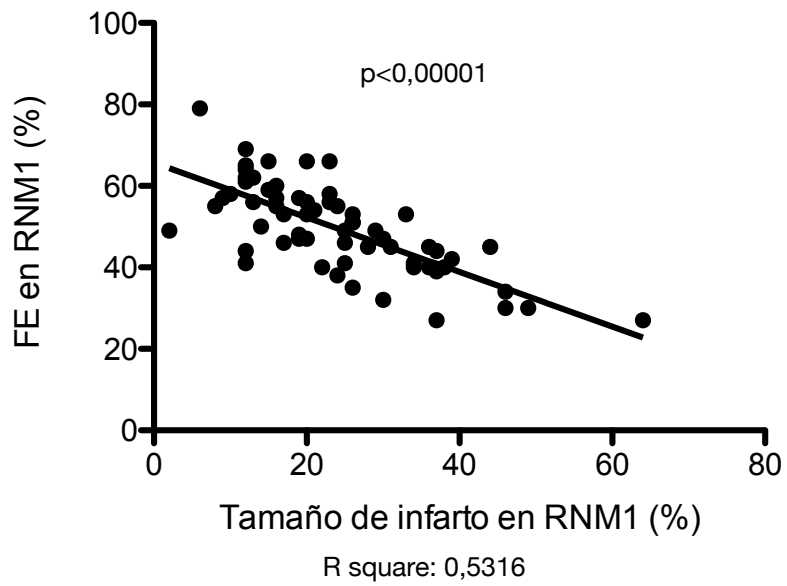
**Correlación entre parámetros bioquímicos de daño miocárdico y tamaño de infarto y fracción de eyección medidos por RNM precoz (RNM1).** En número se expresa el valor de P, obtenido por Rho de Spearman o test de Pearson según distribución de cada variable. CKMB: Fracción miocárdica de creatin kinasa. FE: Fracción de eyección.

## ANEXO 4



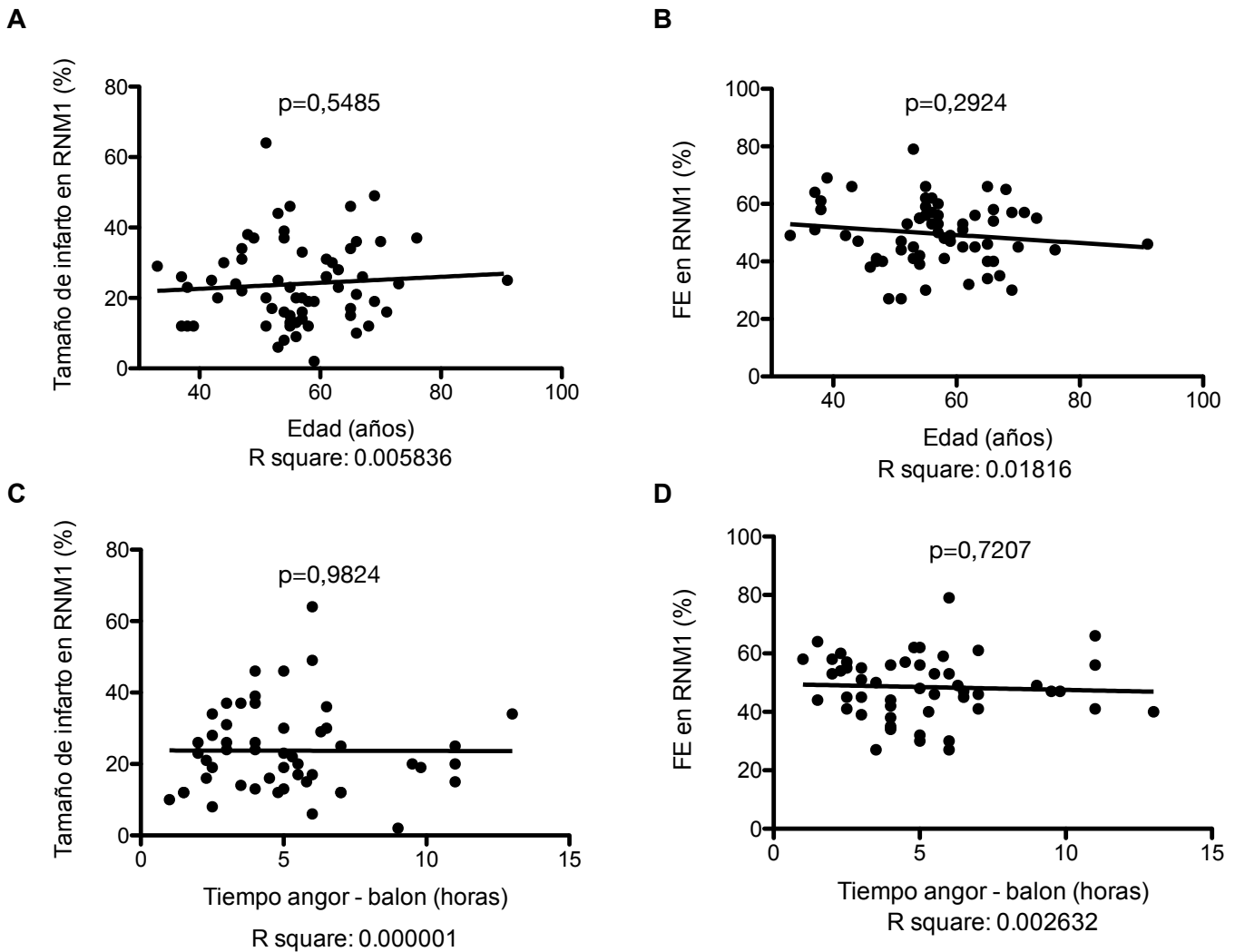
**Concentración de creatinina en sangre periférica entre grupos, como estimador de velocidad de filtración glomerular.** Se tomaron cuatro muestras en condiciones basales, 24 horas post reperfusión, 72 horas post reperfusión y al momento del alta hospitalaria. Comparaciones se realizaron con Mann-Whitney U-test. P: Grupo sometido a terapia con placebo. A: Grupo sometido a infusión de ascorbato.

## ANEXO 4



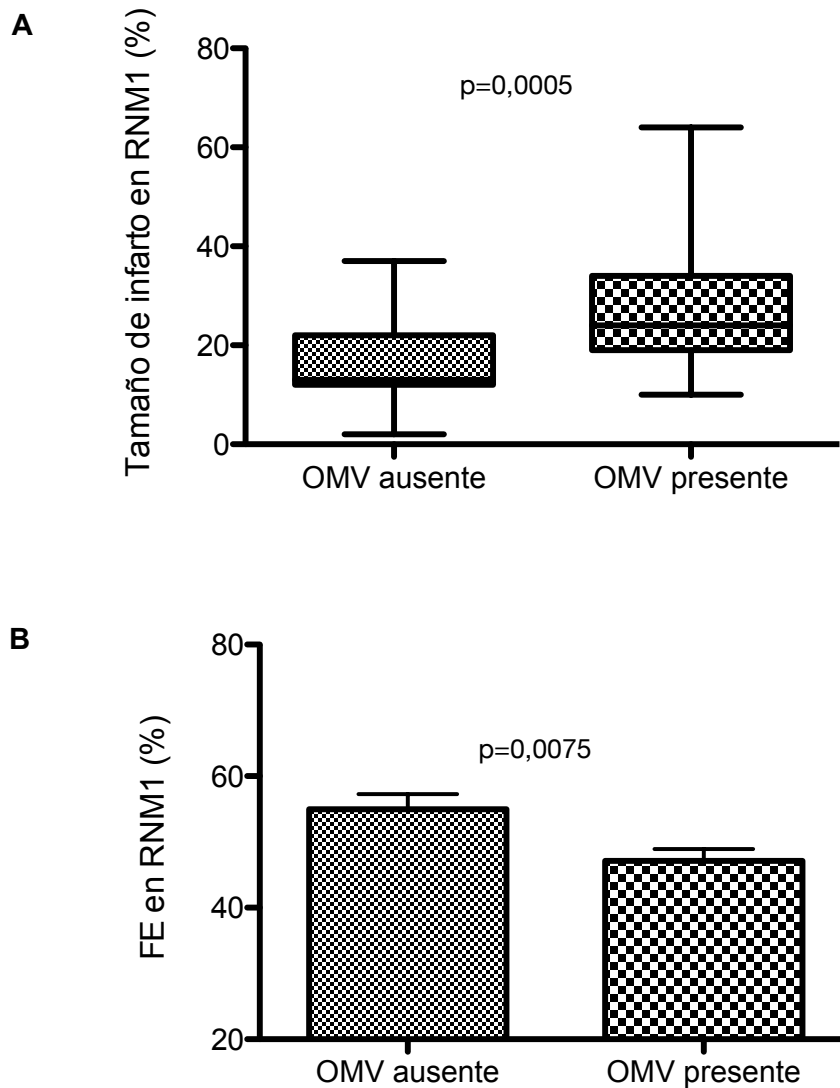
**Correlación entre tamaño de infarto y fracción de eyección (FE) en RNM precoz (RNM1).** Análisis estadístico realizado con Pearson, con GraphPad Prism 7,0.

## ANEXO 4



**Correlación entre variables clínicas y parámetros morfológicos y funcionales medidos por RNM precoz (RNM1).** A: Correlación entre edad y tamaño de infarto, expresado como porcentaje de miocardio infartado. B: Correlación entre edad y fracción de eyección (FE) medida a los 7-20 días por RNM cardíaca. C: Correlación entre el tiempo transcurrido entre inicio de síntomas y la angioplastia coronaria percutánea y el tamaño de infarto medido en RNM precoz. D: Correlación entre el tiempo transcurrido entre inicio de síntomas y la angioplastia coronaria percutánea y la fracción de eyección medida en RNM precoz. El inicio de síntomas fue auto referido por los pacientes. En número se expresa el valor de P, obtenido por Rho de Spearman o test de Pearson según distribución de cada variable.

## ANEXO 4

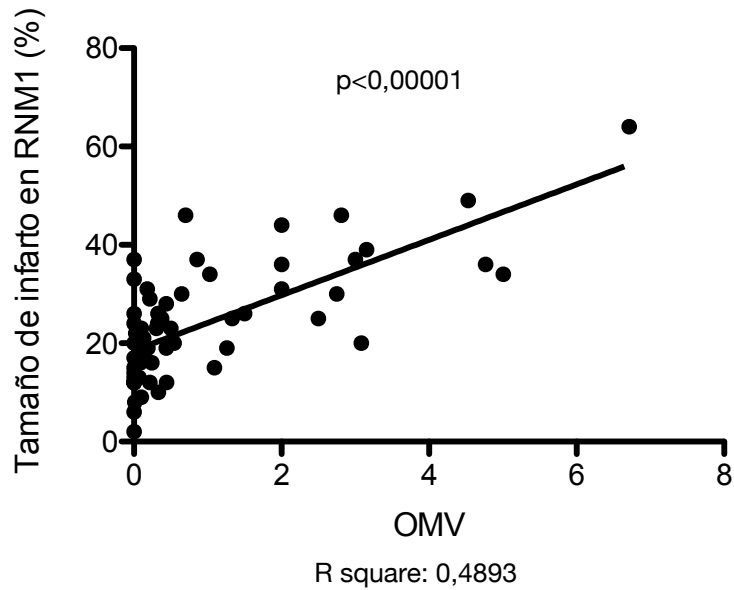


**Comparación entre pacientes con OMV ausente versus OMV presente, y su impacto en parámetros morfofuncionales miocárdicos en RNM precoz (RNM1).** Se compara tamaño de infarto (A), fracción de eyección (B) en RNM cardíaca tomada a los 7-20 días posterior al infarto, entre pacientes que presentaron OMV versus los que no la presentaron. En A se obtuvieron diferencias con Mann-Whitney U-test, y en B mediante Student's t-test. En números se expresa el valor de P.

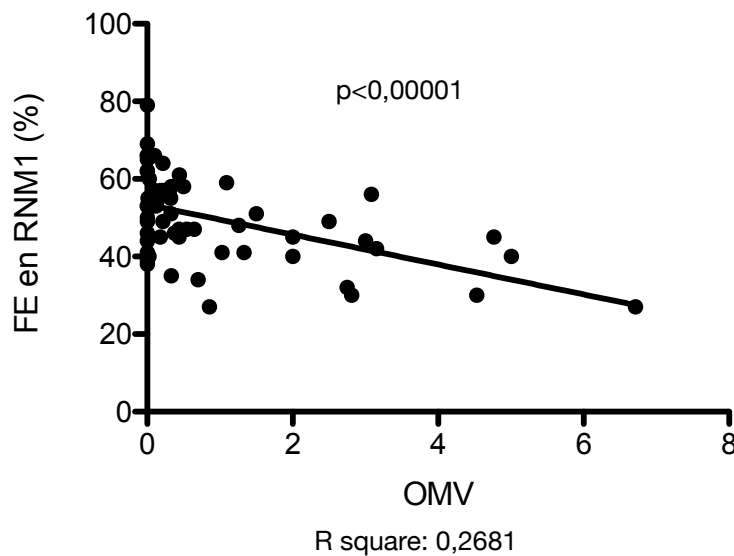


## ANEXO 4

A

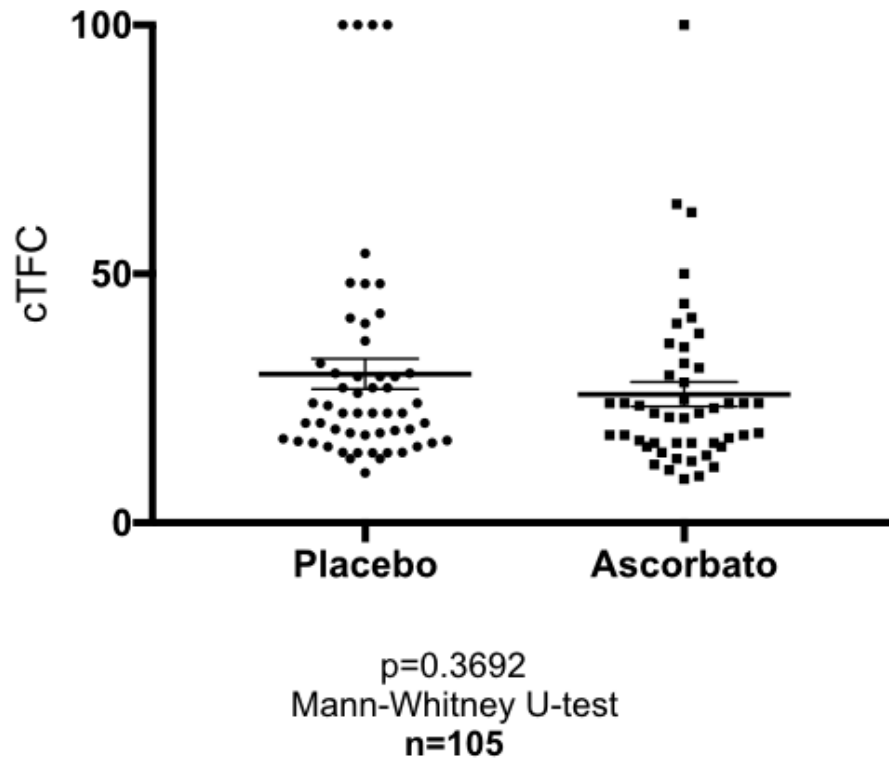


B



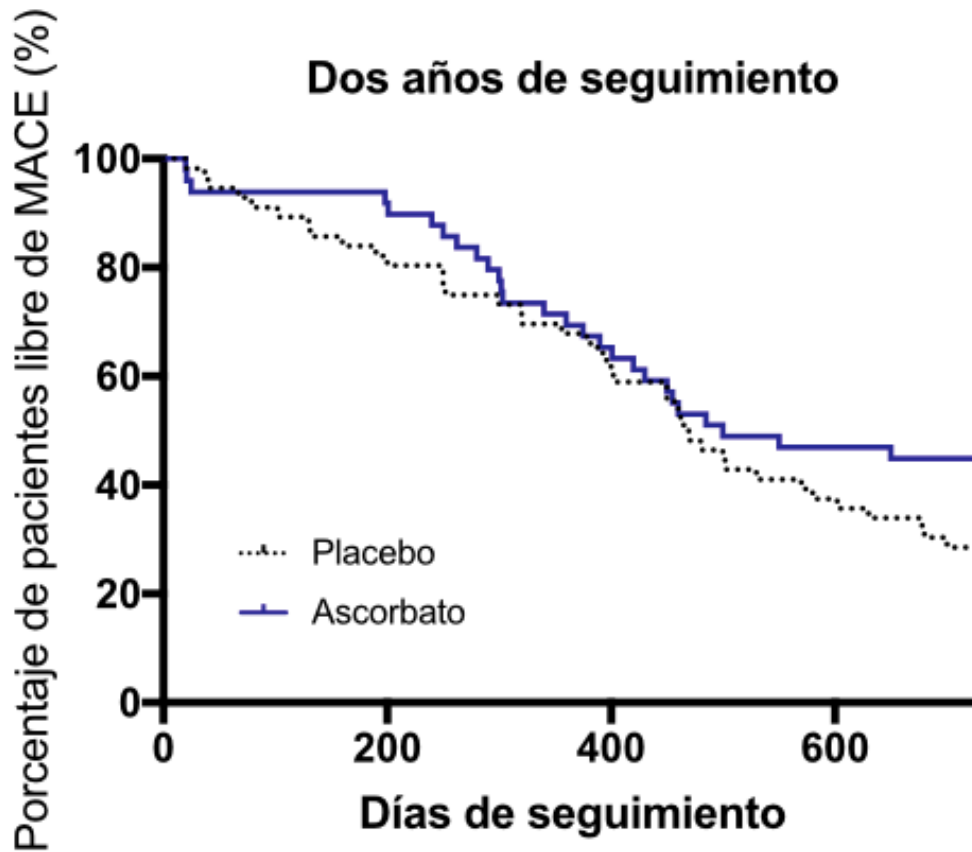
**Correlación entre puntaje promedio de OMV en RNM precoz (RNM1) y parámetros morfológicos y funcionales miocárdicos.** FE: Fracción de eyección. Correlaciones se analizaron por test de Spearman o Pearson según distribución de cada variables. En números se expresa el valor de P.

## ANEXO 4



**Conteo de cuadros TIMI (cTFC) entre grupos.** El puntaje de cTFC va de 1 a 100, y se obtuvo por el análisis de los videos de las angiografías por dos Cardiólogos Intervencionales ciegos a información clínica. Se analizó significancia estadística según distribución paramétrica o no paramétrica de variables (Student's T-test o Mann-Whitney U-test, según corresponda). Análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 7,0. En cada gráfico se representa error estándar.

## ANEXO 4



p value: 0.2876  
n=105

**Curva de Kaplan-Meier con incidencia de MACE a dos años de seguimiento.** Para determinar incidencia de MACE (major adverse cardiovascular events) se contactó por vía telefónica a pacientes o familiares y se completó un cuestionario de 3 preguntas. Se definió MACE como muerte por cualquier causa, nuevo infarto agudo de miocardio o necesidad de cirugía de revascularización miocárdica o angioplastía coronaria, o síntomas de insuficiencia cardíaca (disnea de esfuerzo CF II ó más, disnea paroxística nocturna, ortopnea y/o nicturia)

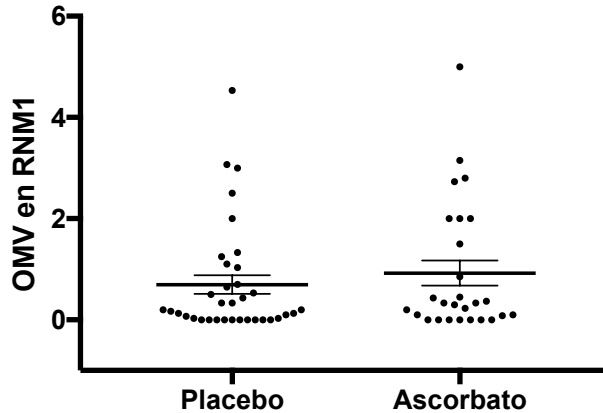
## ANEXO 4

	Placebo	Ascorbato	Total
<b>Número de pacientes enrolados (n)</b>	56	49	105
<b>Número de pacientes fallecidos (n, %)</b>	<b>4</b> (7,14%)	<b>5</b> (10,20%)	<b>9</b> (8,57%)
<b>Centro de enrolamiento</b>	HSJD (3) HCUCh (1)	HSJD (4) HSBA (1)	HSJD (7) HSBA (1) HCUCh (1)
<b>Edad (años)</b>	60,7 ± 13,3	53,3 ± 4,0	57,5 ± 10,4
<b>Sexo (M:F)</b>	3:1	4:1	7:2
<b>Datos angiográficos</b>			
<b>Arteria afectada (n)</b>	4 ADA	4 ADA 1 ACx	8 ADA 1 ACx
<b>TIMI basal 0-1 (n)</b>	4	5	9
<b>TIMI final 2-3 (n)</b>	4	5	9
<b>Acceso para coronariografía (radial:femoral)</b>	4:0	5:0	9:0

**Resumen de los datos de los pacientes que fallecieron durante el estudio (a dos años de seguimiento)** Durante el seguimiento de los pacientes a dos años, fallecieron 9 pacientes, lo que representa un 8,57% del total de los pacientes aleatorizados. cTFC: *Corrected Thrombolysis In Myocardial Infarction frame count*. TPMG: *TIMI myocardial perfusion grade*. HCUCh: Hospital Clínico Universidad de Chile. HSJD: Hospital San Juan de Dios. HSBA: Hospital San Borja Arriarán. ADA: Arteria descendente anterior. ACx: Arteria circunfleja.

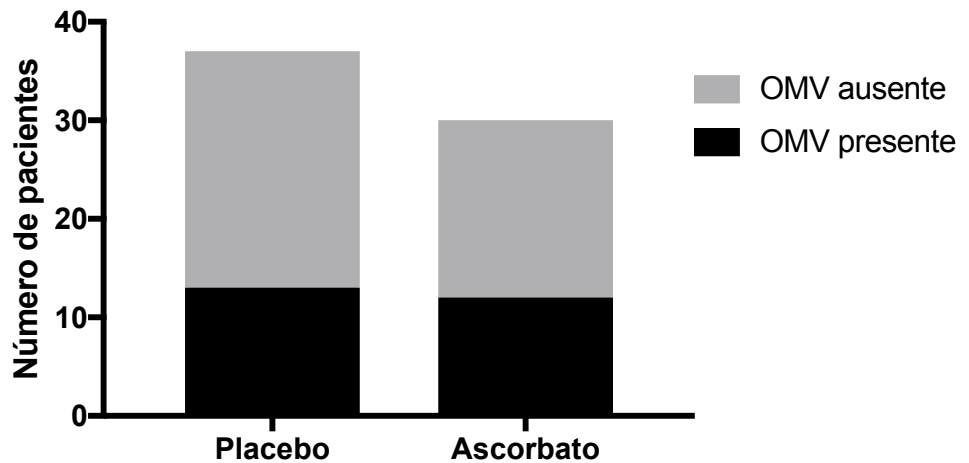
## ANEXO 4

A



p=0.5373  
Mann-Whitney U-test  
n=67

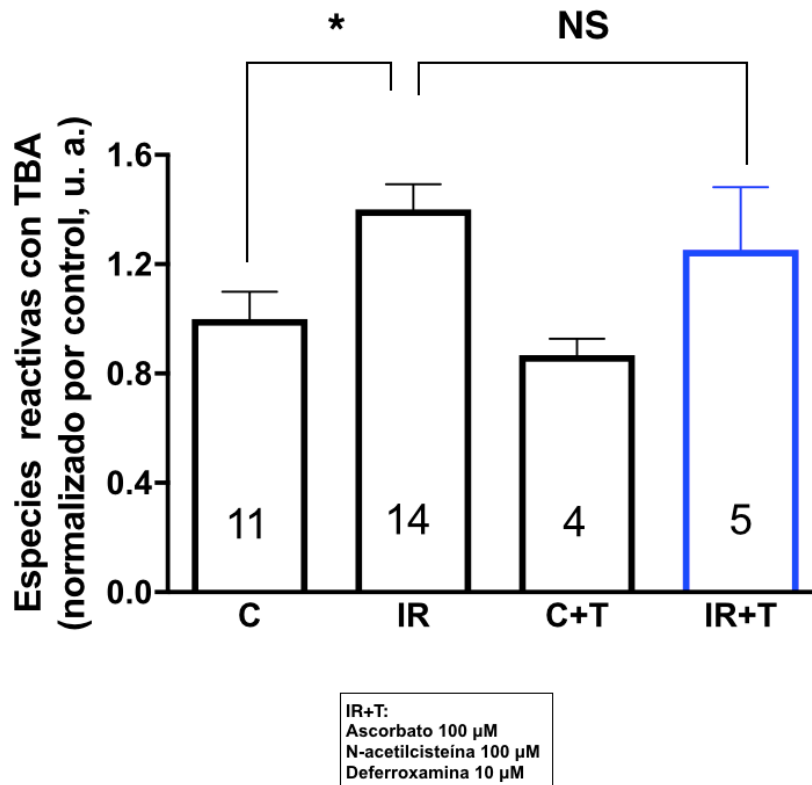
B



p=0.8006  
Test exacto de Fisher  
n=67

**Obstrucción microvascular (OMV) entre grupos.** Se le asignó un puntaje semicuantitativo a la presencia de OMV. En A se observa la comparación del puntaje promedio de OMV entre grupos. En B se observa el porcentaje de pacientes con OMV presente versus ausente, entre grupos. Se analizó significancia estadística según distribución paramétrica o no paramétrica de variables (Student's T-test o Mann-Whitney U-test, según corresponda). Análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 7.0. En cada gráfico se representa error estándar.

## ANEXO 5

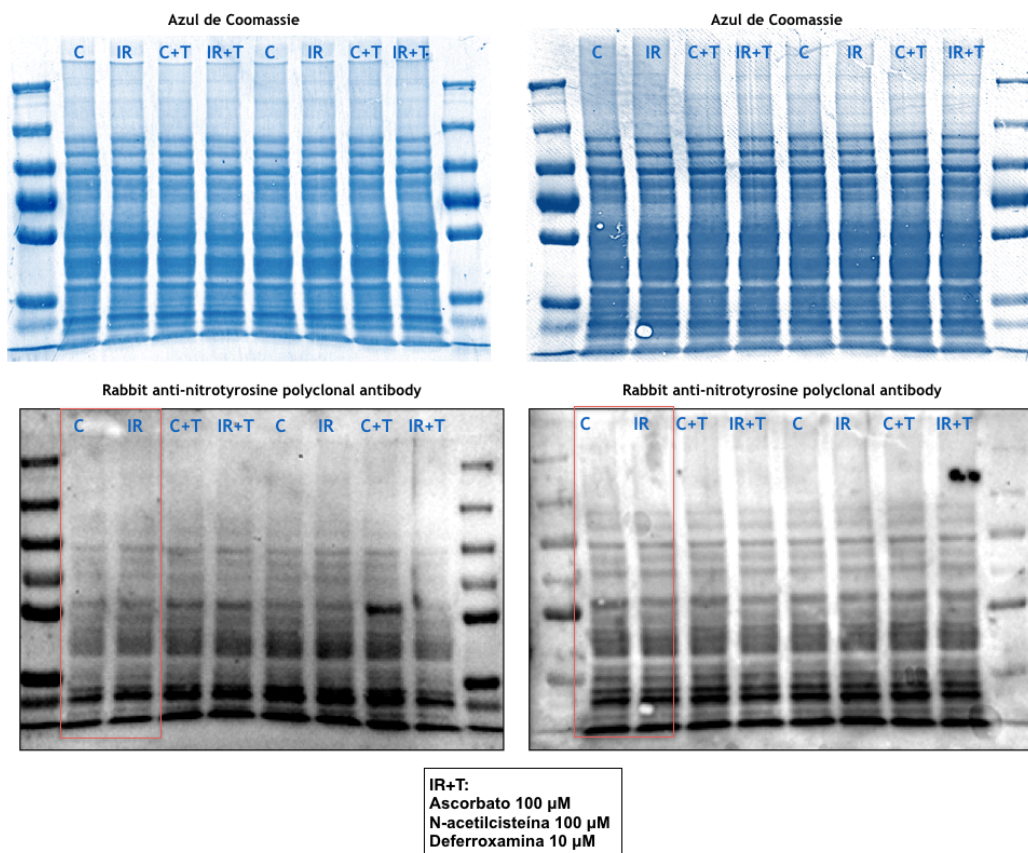


\*:  $p < 0.05$  con respecto a C. Las líneas sobre las barras representan error estándar.

**Contenido de TBARS en tejido miocárdico en ratas sometidas a tratamiento triasociado con AA-NAC-DFO durante la reperusión, en modelo de Langendorff.** TBA: Ácido tiobarbitúrico. TBARS: Especies reactivas con TBA. Contenido de TBARS se determinó por kit de detección espectrofotométrica en tejido miocárdico. Valores se expresan normalizados según el contenido de TBARS en ratas controles. C: Control. IR: Isquemia reperusión sin tratamiento. C+T: Control con tratamiento. IR+T: Isquemia reperusión con tratamiento con AA-NAC-DFO. El número dentro de las barras representa el número de experimentos. Comparaciones se realizaron con ANOVA y test post-hoc de Tukey con GraphPad Prism 7,0. \*:  $p = 0,0185$  con respecto al control (C). Las líneas sobre las barras representan error estándar.

## ANEXO 5

Los residuos de nitrotirosina expresan la nitración del aminoácido tirosina en distintas proteínas celulares debido a la acción específica del peroxinitrito, dando cuenta de forma directa del estrés nitrosativo. Se determinó el estrés nitrosativo en tejido miocárdico mediante la determinación de residuos de nitrotirosina por *western blot*. Se muestra el resultado del análisis de 16 muestras (4 muestras por cada grupo) de experimentos diferentes. En la zona superior se muestra el contenido de proteínas mediante tinción con azul de *Coomassie* y en la zona inferior el contenido de residuos de nitrotirosina. No se observaron diferencias en el contenido de residuos de nitrotirosina entre grupos.



**Contenido de residuos de nitrotirosina en tejido miocárdico en ratas sometidas a tratamiento triasociado con AA-NAC-DFO durante la reperfusión, en modelo de Langendorff.** Contenido de residuos de nitrotirosina se determinó por *western blot*. Se utilizó anticuerpo rabbit anti-nitrotyrosine polyclonal antibody. Millipore Chemicon. Dilución 1/700, incubado por una hora en BSA a temperatura ambiente. C: Control. IR: Isquemia reperfusión sin tratamiento. C+T: Control con tratamiento. IR+T: Isquemia reperfusión con tratamiento con AA-NAC-DFO. Cada carril representa un experimento.