



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

**PREVENCION DE LA FIBRILACION AURICULAR POSTOPERATORIA POR
MEDIO DE UN NUEVO MODELO DE PRE-ACONDICIONAMIENTO NO
HIPOXICO, BASADO EN LA POTENCIACION DE MECANISMOS
ANTIOXIDANTES**

RODRIGO JOSE PIZARRO MARTINEZ

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS MEDICAS
MENCION FISILOGIA**

**Prof. Dr. Ramón Rodrigo S.
Director de Tesis**

2009

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

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina,
que la Tesis de Magíster presentada por el candidato**

RODRIGO JOSE PIZARRO MARTINEZ

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para
optar al Grado de Magíster en Ciencias Médicas con mención en Fisiología
en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 17 de agosto de 2009**

**Prof. Dr. Ramón Rodrigo S.
Director de Tesis
Programa de Farmacología Clínica, ICBM
Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

**Prof. Dr. Enrique Jaimovic P.
Presidente Comisión**

Prof. Dr. Juan Carlos Prieto D.

Prof. Dr. Luis Michea A.

A mi madre y la memoria de mi padre.

Agradecimientos

Quisiera dar las gracias a todos los que hicieron esto posible: a las enfermeras del proyecto, a los ayudantes alumnos y tesisistas, en especial a Rodrigo Castillo. Al técnico de laboratorio Diego Soto. Al profesor Ramón Rodrigo y a todos los profesores que han intentado enseñarme en este largo camino. A mi familia, por aceptar y quererme en mi “humanidad,” por momentos... demasiado “humana.” Finalmente quisiera agradecer a todos esos pacientes que me han conmovido una y otra vez con su apoyo desinteresado. Este esfuerzo es para todos ustedes.

Muchas gracias a todos.

Santiago, agosto de 2009

Índice

1. Resumen	7
2. Abstract	10
3. Introducción	13
3.1 El problema y sus dimensiones	14
3.2 Mecanismos del daño miocárdico por isquemia-reperusión	16
3.3 Patogénesis de la fibrilación auricular	17
3.4 El rol de la defensa antioxidante	19
3.5 Mecanismos antioxidantes enzimáticos	19
3.6 Mecanismos antioxidantes no-enzimáticos	20
3.7 Un nuevo modelo de pre-acondicionamiento no hipóxico	20
3.8 Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3	20
3.9 Vitamina C y vitamina E	23
4. Hipótesis	25
5. Objetivos	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos específicos	26
6. Métodos	26
6.1 Diseño experimental	27
6.1.1 Criterios de inclusión	27
6.1.2 Criterios de exclusión	28
6.1.3 Protocolo de intervención	28
6.1.4 Variables clínicas a considerar	29

6.1.5	Pesquisa del endpoint primario	31
6.1.6	Endpoints secundarios y técnicas utilizadas	32
6.1.7	Análisis estadístico	35
7.	Resultados	36
7.1	Reclutamiento y seguimiento	40
7.2	Sobre la muestra y sus características	40
7.3	Endpoint primario	41
7.4	Endpoints secundarios	42
8.	Discusión	45
9.	Proyecciones y comentarios finales	54
10.	Referencias	56

1. Resumen

La circulación extracorpórea ha permitido el nacimiento y desarrollo de la cirugía cardíaca, sin embargo durante ésta, se reproduce un modelo clínico de isquemia-reperfusión. La isquemia miocárdica, se asocia a un explosivo aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales son liberadas de manera violenta y masiva durante la perfusión. Este fenómeno ha sido ampliamente vinculado a la patogénesis de múltiples enfermedades y complicaciones postoperatorias. La fibrilación auricular es la arritmia cardíaca de mayor incidencia en la población adulta, asociada a un riesgo independiente de morbilidad y mortalidad neurológica. La fibrilación auricular postoperatoria (FAPO), así mismo, es la complicación más frecuentemente asociada a la cirugía cardíaca con circulación extracorpórea, aumentando considerablemente los tiempos y costos de hospitalización de estos pacientes. Una vez gatillada la arritmia, existe un alto riesgo de su perpetuación y necesidad de tratamiento farmacológico permanente. Para su prevención se han intentado múltiples esquemas terapéuticos, con resultados subóptimos. Existe creciente evidencia del papel que puede cumplir el estrés oxidativo en el mecanismo de producción y perpetuación de la fibrilación auricular. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha caracterizado debidamente la actividad del sistema de defensa antioxidante ni su eventual papel protector contra la injuria oxidativa en este contexto clínico. Así tampoco ha sido caracterizada debidamente la participación de este sistema en modelos de pre-acondicionamiento cardíaco no hipóxico.

En la presente tesis, se analizó un nuevo modelo de pre-acondicionamiento no hipóxico para la prevención de la FAPO, basado en la potenciación de mecanismos antioxidantes. En este modelo, el estímulo pre-acondicionante estaría dado por el establecimiento de un estrés oxidativo suficiente para la inducción de mecanismos antioxidantes, secundario a la suplementación con ácidos de cadena larga poliinsaturados omega 3 (PUFA n-3). Una vez establecido el pre-acondicionamiento, se dio un segundo paso de reforzamiento de la defensa antioxidante mediante el aporte de vitamina C y vitamina E, para alcanzar protección máxima durante la reperfusión. El objetivo principal de esta tesis fue comprobar que la suplementación preoperatoria con PUFA n-3, seguida de las vitaminas C y E, es efectiva en disminuir la ocurrencia de FAPO en la población estudiada, por medio de la potenciación de la defensa antioxidante sistémica. Para probar la hipótesis se realizó un estudio prospectivo, placebo-controlado, randomizado, doble ciego, en pacientes basalmente en ritmo sinusal, que fueron sometidos a cirugía cardiaca con circulación extracorpórea en los hospitales Clínico de la Universidad de Chile y San Juan de Dios entre julio de 2007 y mayo de 2009. Se administraron PUFA n-3 desde el séptimo día preoperatorio, a lo cual se agregaron vitaminas C y E dos días antes de la cirugía. El tratamiento completo se mantuvo hasta el alta. Se analizaron muestras de sangre seriadas obtenidas durante el protocolo y muestras de tejido miocárdico obtenido durante la cirugía para determinaciones del potencial antioxidante sistémico.

Se espera de esta manera contribuir a la prevención de una enfermedad de alta prevalencia y morbilidad asociada, que agrega a los costos y prolonga la

hospitalización de estos pacientes. Esto se realizaría por medio de una intervención segura, fácil administración y de bajo costo. Así mismo, se pretende aportar a la caracterización de un nuevo modelo de pre-acondicionamiento no hipóxico y su rol protector frente a una enfermedad que estaría fuertemente vinculada en su patogénesis y perpetuación al estrés oxidativo.

2. Abstract

Extracorporeal circulation has permitted the born and development of cardiac surgery however, during these procedures a clinical model of ischemia-reperfusion is reproduced. Miocardial ischemia is associated to an explosive augment in the production of reactive oxygen species. These are liberated in a violent and massive manner during reperfusion. This phenomenon has been widely associated to the pathogenesis of several diseases and postoperative complications. Atrial fibrillation is also the most prevalent cardiac arrhythmia among adult population. It has been determined as an independent risk of neurological morbidity and mortality. Postoperative atrial fibrillation is the most frequent complication of cardiac surgery with extracorporeal circulation, considerably increasing the time and cost of hospitalization of these patients. Once the arrhythmia has been triggered, there is a high risk of perpetuation and need for permanent pharmacological treatment. Several strategies for the prevention of this problem have been tested with suboptimal results. There is growing evidence regarding the role of oxidative stress in the mechanisms of establishment and perpetuation of atrial fibrillation. However, up to date, the activity of the antioxidant defense system and eventual protective effect against oxidative injury in this clinical setting has not been properly characterized. The participation of the antioxidant system in models of non-hypoxic preconditioning has not been well characterized either.

In this thesis, will test a novel strategy of non-hypoxic preconditioning for the prevention of postoperative atrial fibrillation, based in the potentiation of

antioxidant mechanisms. In this model, the preconditioning stimuli was given by the establishment of oxidative stress, sufficient for the induction of antioxidant mechanisms, secondary to the supplementation with long-chain polyunsaturated omega 3 fatty acids (PUFA n-3). Once the preconditioning event was established, a second step of antioxidant reinforcement was given through the supplementation with vitamin C and vitamin E, to achieve maximum protection during reperfusion. The primary objective of this thesis was to corroborate that the supplementation with PUFA n-3, followed by vitamins C and E, is effective in diminishing the occurrence of postoperative atrial fibrillation in the studied population, secondary to a potentiation of the antioxidant defense system. To test the hypothesis, a prospective, placebo-controlled, randomized, double blind clinical trial took place among patients, in basal sinus rhythm, submitted to cardiac surgery with extracorporeal circulation at Universidad de Chile Clinical and San Juan de Dios hospitals between July 2007 and May 2009. The PUFA n-3 were administered beginning 7 days before surgery. Vitamins C and E were added 2 days before surgery. The complete treatment was maintained until discharge. Seriated blood drawn throughout the protocol and myocardial tissue samples obtained during surgery were used for systemic antioxidant potential determinations.

Hopefully this work will contribute to the prevention of a highly prevalent disease with relevant associated morbidity that increases the costs and prolongs the hospitalization of these patients. This would be achieved through a safe, easily administered, low-cost intervention. On the same basis, this work should further contribute to the characterization of a new model of non-hypoxic preconditioning

and its protective role against a disease tightly linked in its pathogenesis and perpetuation to oxidative stress.

3. Introducción

En condiciones fisiológicas, se produce en el miocardio un balance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), provenientes del metabolismo normal y los mecanismos de defensa antioxidante. Sin embargo, ya sea por un aumento en la producción de ERO o por una disminución efectiva de la defensa antioxidante, puede producirse un desbalance que se conoce como estrés oxidativo. Éste, dependiendo de su magnitud, puede tener distintas implicancias en la fisiología de la célula (Valko *et al.*, 2007). Bajo condiciones de estrés oxidativo masivo, como las producidas durante mecanismos de isquemia y reperfusión al ser sobrepasada ampliamente la defensa antioxidante puede producirse gran daño celular. En el miocardio, esto se traduciría en daño considerable a estructuras subcelulares y de sobrepasar la *noxa* un “punto sin retorno,” en muerte celular por distintos mecanismos. Esto lleva a las múltiples complicaciones clínicas asociadas al fenómeno de isquemia y reperfusión. (Murry *et al.*, 1986; Becker, 2004; Rodrigo, Castillo *et al.*, 2007).

Existen sin embargo condiciones bajo las cuales el estrés oxidativo puede mediar un efecto cardioprotector. El concepto de pre-acondicionamiento miocárdico isquémico nace de la observación que, episodios de isquemia breve, otorgarían un efecto cardioprotector frente a una segunda isquemia más prolongada. (Murry *et al.*, 1986). Con posterioridad se ha visto que la inducción de cardioprotección por pre-acondicionamiento isquémico, es dependiente de la producción de ERO, siendo abolida por la presencia de antioxidantes durante el

periodo de isquemia-reperfusión (Vanden Hoek *et al.*, 1998). Tras estas observaciones, se han intentado múltiples modelos, tanto hipóxicos como no hipóxicos, de pre-acondicionamiento miocárdico, para distintas aplicaciones clínicas con efectividad variable (Yogarathnam *et al.*, 2006; Korantzopoulos *et al.*, 2007; Domenech *et al.*, 2007). Debido a las importantes limitaciones de la aplicabilidad clínica de los modelos hipóxicos de pre-acondicionamiento, en el presente estudio proponemos un nuevo modelo cardioprotector, basado en el reforzamiento de la defensa antioxidante sistémica. Este se fundamenta en el establecimiento de un pre-acondicionamiento miocárdico no hipóxico, asociado a un posterior reforzamiento por medio de la suplementación con antioxidantes exógenos. De esta forma se espera prevenir la incidencia de fibrilación auricular postoperatoria (FAPO), complicación en directa relación con el estrés oxidativo al que son sometidos los pacientes durante la cirugía cardiaca con circulación extracorpórea (CEC).

3.1 El problema y sus dimensiones

En Chile, las enfermedades cardiovasculares son la principal fuente de mortalidad tanto en hombres como mujeres. El año 2003, el 28.4% de las 83,672 defunciones registradas fueron atribuibles a causas cardiovasculares. Consecuentemente, un 55% de la población mayor de 15 años en Chile presenta riesgo cardiovascular alto o muy alto por lo cual, muchos de ellos requerirán de cirugía cardiaca en algún momento de sus vidas. (Solimano *et al.*, 2007).

La fibrilación auricular es la arritmia cardiaca sostenida más frecuente en la población adulta, incluso en ausencia de cardiopatía estructural (Morrillo *et al.*, 1995; da Cunha *et al.*, 2007). Se asocia a mayor riesgo de accidente vascular encefálico y es un predictor independiente de mortalidad (Morillo *et al.*, 1995). Se caracteriza electrocardiográficamente por la presencia de ondas fibrilatorias rápidas e irregulares que varían en tamaño, morfología y temporalidad. Estos hallazgos generalmente se correlacionan con una respuesta ventricular irregular (Falk *et al.*, 2001). La fibrilación auricular postoperatoria, se define como la incidencia de esta arritmia, evidenciada de manera electrocardiográfica, en pacientes recientemente sometidos a cirugía cardiaca (Ramlawi *et al.*, 2007). La FAPO es la complicación más frecuentemente asociada a pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica (CRM) y otros procedimientos quirúrgicos realizados con CEC (Rodrigo *et al.*, 2008; Rodrigo *et al.*, 2009; Aranki *et al.* 1996; Caló *et al.*, 2005; Lamm *et al.*, 2005). Se presenta con mayor frecuencia entre el segundo y cuarto día postoperatorio en un 30 a 40% de los pacientes sometidos a CRM (Wu *et al.*, 2003) y hasta un 64% de los pacientes que enfrentan intervención quirúrgica por patología valvular (Hogue *et al.*, 2000). Entre los principales factores de riesgo para desarrollar FAPO se encuentra el antecedente previo de FA, edad mayor a 70 años, sexo masculino, cardioprotección insuficiente durante la cirugía, uso de CEC, hipertensión arterial crónica (HTA), duración de onda P en ECG basal (*i.e.*: tamaño aurícula izquierda), suspensión preoperatoria de beta-bloqueadores, disfunción sistólica de VI y oclusión de ACD. (Aranki *et al.*, 1996). Si bien la FAPO no es la complicación más compleja ni cara de tratar, al ser la más frecuente, se traduce en mayores costos, al asociarse a mayor tiempo de

hospitalización, (Aranki *et al.*, 1996; Hogue *et al.*, 2000) morbilidad neurológica y necesidad de terapia antiarrítmica y anticoagulante. (Villareal *et al.*, 2004). Se han intentado desarrollar múltiples intervenciones terapéuticas con resultados subóptimos, con lo que la incidencia de FAPO, prácticamente no se ha modificado (Hohnloser, 1998).

3.2 Mecanismos del daño miocárdico por isquemia-reperfusión

En pacientes sometidos a cirugía cardíaca con CEC se reproduce un modelo clínico de estrés oxidativo por isquemia y reperfusión (Rodrigo *et al.*, 2007). Durante el periodo de isquemia, se produce un aumento en la producción de ERO, probablemente de origen mitocondrial, NADPH oxidasa, óxido nítrico sintasa (NOS), xantina oxidasa (XO) polimorfonucleares neutrófilos y otras fuentes celulares aún no claramente identificadas. Se piensa que al restablecer la perfusión, la liberación masiva de las ERO producidas durante la hipoxia, puede llevar a gran daño tisular de los órganos reperfundidos (Yellon *et al.*, 2007; Ferdinandy *et al.*, 2007). Durante la isquemia, la disminución de la PO_2 y sustrato metabólico llevan a una disminución en la producción de ATP lo que se traduce en aumento del Ca^{+2} intracelular y función disminuida de la bomba Na^+/K^+ ATPasa. El aumento de lactato, H^+ y P_i por la isquemia conducen a hipercontractura del cardiomiocito, activación de proteasas e injuria osmótica. Esto produce daño celular, que dependiendo de su magnitud, puede conducir a necrosis y/o activación de vías pro-apoptóticas. (Yellon *et al.*, 2007; Ferdinandy *et al.*, 2007). Sin embargo por otro lado y dependiendo de su magnitud, las ERO también

pueden actuar como mediadores o mensajeros intracelulares, activando factores transcripcionales sensibles al estado redox que conduzcan a una activación de la expresión de genes proinflamatorios, lo que aumenta y perpetúa el estrés celular. (Kawano *et al.*, 2006; Issac *et al.*, 2007). No está muy claro qué es lo que ocurre durante la reperfusión. Se piensa que produce una súbita y violenta liberación de ERO desde las diversas fuentes comentadas. Esto se relacionaría a un mayor aumento del Ca^{+2} intracelular e injuria osmótica, resultando en activación de la vía apoptótica intrínseca, vía mPTP y necrosis, respectivamente. La muerte celular por distintas vías lleva a remodelamiento cardíaco, en el cual, tejido miocárdico normal es reemplazado por tejido fibrótico (Yellon *et al.*, 2007; Ferdinandy *et al.*, 2007).

3.3 Patogénesis de la fibrilación auricular

La patogenia de la FA, sigue siendo un tema sólo parcialmente comprendido. Clásicamente se explica la generación de la arritmia como precipitada por una enfermedad subyacente del tejido auricular, generalmente fibrosis o inflamación. Existiría luego una segunda noxa que actuaría como gatillante de la enfermedad (Falk *et al.*, 2001). Entre los múltiples factores condicionantes en el desarrollo de la FAPO se encontrarían el aumento del tono simpático en el periodo postquirúrgico, inflamación pericárdica, presencia de fibrosis previa y dilatación auricular. (Falk *et al.*, 2001; Amar *et al.*, 2003; Olshansky *et al.*, 2005). En condiciones de fibrosis e inflamación, existirían alteraciones en la conducción auricular favoreciendo la generación de arritmias. En este tejido se pueden producir múltiples focos de reentrada, los que al

descargar asincrónicamente hacen fibrilar a la aurícula. (Falk *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2004; Jalife *et al.*, 2003). Otro mecanismo descrito para la generación de FA es por alteraciones de células automáticas ubicadas en venas pulmonares. Estas células, podrían aumentar su frecuencia de descarga, generando taquicardia auricular rápida, desencadenando fibrilación auricular izquierda. (Fynn *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006). Durante la FA pueden producirse procesos de remodelación eléctrica, secundario a cambios en la expresión de genes que codifican para subunidades de canales de Ca^{+2} tipo-L y canales de K^{+} (Brundel *et al.*, 2002). Estudios histopatológicos han podido demostrar que se induce un aumento del tejido fibroso auricular. Esta fibrosis, hace más susceptible a la aurícula a fibrilar bajo condiciones de estrés (Adler *et al.*, 2003; Goette *et al.*, 2004). El desarrollo de FA lleva a cambios eléctricos y estructurales en la aurícula por un proceso que ha sido acuñado como remodelamiento. Estos cambios explican que en presencia de cardiopatía estructural, se favorezcan las condiciones para la generación y perpetuación de FA (Issac *et al.*, 2007). Actualmente se le atribuye un importante papel a la inflamación en la generación y perpetuación de FA, secundaria al estrés oxidativo que sufren los pacientes sometidos a cirugía cardíaca. Los pacientes que desarrollan FAPO presentan un mayor estrés oxidativo agudo, lo cual se traduce en mayor oxidación miocárdica. Bajo esta premisa, actualmente se realizan estudios clínicos para demostrar el papel de algunos agentes farmacológicos en la prevención de FA, basado en los efectos antioxidantes de estatinas, iECA y ARAII (Issac *et al.*, 2007).

3.4 El rol de la defensa antioxidante

En condiciones de hipoxemia, existiría un aumento en la producción de superóxido. Por acción de superóxido dismutasa, el superóxido es reducido a peróxido, el cual aumenta de manera importante en isquemia, al verse sobrepasadas las enzimas glutatión peroxidasa y catalasa. Durante la reperfusión se produciría gran liberación de peróxido de hidrógeno, el cual reaccionaría en el citoplasma con cationes orgánicas como Fe^{+2} por reacción de Fenton para producir radical hidroxilo. Una vez producida esta ERO altamente reactiva, el daño celular es inevitable, ya sea a través de peroxidación lipídica, denaturación proteica y/o daño al DNA (Becker, 2004). Para la defensa contra el estrés oxidativo, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, la célula cuenta con mecanismos de defensa antioxidante, que se pueden dividir con fines esquemáticos en enzimáticos y no enzimáticos.

3.5 Mecanismos antioxidantes enzimáticos

Las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (GSH-Px) constituyen la primera línea de defensa contra las ERO producidas en el miocardio tanto en condiciones normales como en estados patológicos. La actividad de estas enzimas estaría condicionando la susceptibilidad de este tejido frente al efecto deletéreo de las ERO. Sin embargo, el papel de estos mecanismos antioxidantes en la generación de FAPO aún no ha sido debidamente dilucidado.

3.6 Mecanismos antioxidantes no-enzimáticos

Ha sido descrito con anterioridad que pacientes sometidos a cirugía cardiaca presentan durante el procedimiento quirúrgico una elevación de productos de lipoperoxidación en plasma y disminución de los niveles de glutatión cardiaco durante la cirugía, lo que sería secundario a un aumento del estrés oxidativo (de Vecchi *et al.*, 1998). Sin embargo, no se ha correlacionado la totalidad de los parámetros responsables del potencial antioxidante con el riesgo de FAPO.

3.7 Un nuevo modelo de pre-acondicionamiento no hipóxico

A pesar de la alta eficacia de los modelos de pre-acondicionamiento hipóxico, éstos no se han podido aplicar con seguridad en pacientes humanos. A raíz de esto, se han buscado nuevas maneras de inducir protección miocárdica de múltiples maneras para distintas aplicaciones clínicas donde se reproducen modelos de IR.

3.8 Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3

Existe suficiente evidencia epidemiológica para sustentar la disminución de mortalidad por diversas causas cardiovasculares asociadas al consumo de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (PUFA n-3) (Tziomalos *et al.*, 2007). Debido a esto, la recomendación actual de la American Heart Association (AHA),

es de promover el consumo de PUFA tanto en prevención primaria como secundaria de enfermedades cardiovasculares (London *et al.*, 2007). Existe también importante evidencia experimental, observacional y obtenida por medio de estudios clínicos que demuestran que el consumo de PUFA disminuye la incidencia de arritmias ventriculares fatales y existe gran expectativa sobre el posible beneficio que estos compuestos pudieran tener en la prevención de arritmias supraventriculares (London *et al.*, 2007). En el Diet and Reinfarction Trial (DART), primer estudio clínico sobre el rol de los PUFA n-3 en prevención cardiovascular secundaria, demostró una reducción de un 29% de la mortalidad entre 1015 hombres con infarto al miocardio (IM) reciente. Un grupo de pacientes fue asignado al azar a dos porciones semanales de pescado oleoso, para ser comparados con igual número de controles (Burr *et al.*, 1989). Posteriormente, el Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI-Prevenzione) reclutó en estudio clínico a 11,324 pacientes con IM reciente para recibir 850mg al día de EPA+DHA. A 3.5 años de seguimiento la intervención redujo significativamente mortalidad, IM no letal y accidentes vasculares encefálicos (AVE) en comparación al grupo control. Estos beneficios se vieron asociados a una reducción de 45% de arritmias letales (Marchioli *et al.*, 2002). Finalmente, el Fatty Acid Antiarrhythmia Trial (FAAT) incluyó a 402 pacientes con desfibrilador implantable, por un episodio previo de paro cardíaco. Fueron randomizados a cápsulas de 2.6 g al día de EPA+DHS o placebo. Al momento del análisis los suplementados presentaron un riesgo relativo de 0.62 (IC 95%: 0.32 a 0.83; p=0.006). Es decir, una reducción del 32% de arritmias fatales (Leaf *et al.*, 2005).

El mecanismo por el cual los PUFA n-3 ejercen su función antiarrítmica está por aclararse. Se piensa que podría explicarse al menos en parte por la capacidad que tienen los PUFA n-3 de modificar el estado redox intracelular. (London *et al*, 2007). Existiría un aumento del estrés oxidativo inicial secundario al consumo de PUFA n-3, basado en la teoría del aumento de la oxidabilidad de los ácidos grasos. La incorporación de PUFA n-3 puede aumentar el índice de insaturación de membranas lipídicas y lipoproteínas y llevar a una mayor lipoperoxidación en una etapa inicial de su consumo. Esto condicionaría una potenciación de mecanismos antioxidantes, que explicaría la disminución final de los parámetros de estrés oxidativo que se han observado en el consumo prolongado de estos ácidos grasos. (Nenseter *et al.*, 1996; Mori *et al.*, 2003). Estos mecanismos, sin embargo permanecen aún sin caracterizar por completo.

El grupo de Caló por primera vez utiliza un modelo clínico de preconditionamiento no-hipóxico basado en la suplementación con PUFA n-3. Describe como resultado de su ensayo clínico randomizado que la suplementación con PUFA n-3, desde el quinto día preoperatorio hasta el alta, disminuye en un 54,4% la incidencia de FAPO, en pacientes sometidos a cirugía cardíaca. (Caló *et al.*, 2005). Sin embargo, buena parte de los pacientes en este estudio, fueron sometidos a cirugía cardíaca fuera de bomba, sin que este factor fuera considerado al momento de analizar los datos. Esto, a pesar que existe evidencia, que al menos en cirugía de revascularización miocárdica, el uso de CEC es una fuente de estrés oxidativo adicional. (Matata *et al.*, 2000). Tampoco se consideró el rol del consumo de drogas a las que se les atribuido propiedades

antioxidantes como las estatinas al momento de la cirugía. Si bien aún no existe evidencia clínica concluyente, actualmente se evalúa el rol antiarrítmico, atribuible a las propiedades antioxidantes de las estatinas (Shiroshita-Takeshita *et al.*, 2004; Howard *et al.*, 2008).

3.9 Vitamina C y Vitamina E

Las vitaminas antioxidantes C y E son importantes antioxidantes que actúan a distintos niveles celulares. La vitamina C actúa en los componentes hidrosolubles, mientras que la vitamina E lo hace en lugares liposolubles, es decir principalmente en membranas biológicas. Actúan de manera sinérgica, ya que el α -tocoferol al perder un electrón pasa a formar el radical α -tocoferoxilo, pudiendo ser rescatado por el poder reductor de la vitamina C, quien actúa como un donante de electrones. (Rodrigo *et al.*, 2009) Además de su más conocida acción de “scavenger” de ERO, también estas vitaminas antioxidantes ejercen complejas acciones de modulación redox en el endotelio vascular, tono de músculo liso, inflamación y agregación plaquetaria (Newaz *et al.*, 2005; Pignatelli *et al.*, 2005; Guney *et al.*, 2007). Así mismo pueden inducir regulación hacia abajo de la enzima NADPH oxidasa, previniendo el estrés oxidativo antes que se establezca (Ulker *et al.*, 2003).

El ácido ascórbico es capaz de disminuir el estrés oxidativo en los pacientes sometidos a cirugía cardíaca. Carnes *et al.*, describieron en modelo canino de taquiarritmia, que la suplementación con vitamina C endovenosa durante la

arritmia disminuyó el remodelamiento auricular, lo que se asoció a un aumento de la formación de peroxinitrito y disminución de ascorbato tisular miocárdico de sujetos controles versus tratados con vitamina C. Posteriormente, en estudio clínico, suplementado con una dosis de carga de 2 g de ácido ascórbico el día previo a la cirugía, seguido de 500 mg dos veces al día hasta el quinto día postoperatorio, lograron disminuir la incidencia de FAPO de un 34,9% a un 16,3% en pacientes sometidos a CRM con CEC. (Carnes *et al.*, 2001). Estos hallazgos se contradicen con los datos de Shiroshita-Takeshita *et al.*, quienes encontraron una disminución del remodelamiento en perros tratados con estatinas, lo que no ocurrió en aquellos tratados con vitamina C. (Shiroshita-Takeshita *et al.*, 2004). Posteriormente, se observó en un estudio clínico que pacientes suplementados con vitamina C, disminuyeron la recurrencia de FA de 36,3% a 4,5% al séptimo día de seguimiento luego de ser sometidos a cardioversión eléctrica. (Korantzopoulos *et al.*, 2005). Últimamente, un nuevo ensayo clínico confirma el papel del ascorbato en la prevención de la FAPO en pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica con CEC. Los pacientes en este trabajo fueron randomizados, al menos una semana previa a la cirugía, a tratamiento con betabloqueadores, o betabloqueo más ascorbato. Este último, con una dosis de carga de 2 g la noche previa al procedimiento y 1 g al día hasta el quinto día postoperatorio. La incidencia de FAPO fue de 4% en el grupo con ácido ascórbico y de 26% en el grupo que sólo recibió betabloqueo (Eslami *et al.*, 2007). Con todo esto, podemos afirmar un papel del ácido ascórbico en la prevención primaria de FAPO en CRM. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce el producto de la interacción con un antioxidante hidrofóbico como vitamina E. En el desarrollo del

presente trabajo esperamos ampliar el papel del ascorbato a la profilaxis de FAPO en cirugías por otras miocardiopatías no congénitas y caracterizar la respuesta del potencial antioxidante frente a la combinación de ambas vitaminas y su interacción con los PUFA n-3.

4. Hipótesis

El pre-acondicionamiento con PUFA n-3 y posterior suplementación con vitaminas antioxidantes (C + E), disminuirá la incidencia de FAPO en pacientes sometidos a cirugía cardiaca con CEC por cardiopatías no congénitas. Este efecto se asociará a una potenciación de mecanismos antioxidantes sistémicos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Obtener una caracterización bioquímica del potencial antioxidante sistémico de pacientes que recibirán suplementación con PUFA n-3 más vitaminas antioxidantes o placebo y determinar su relación con el riesgo de desarrollar FAPO luego de ser sometidos a cirugía cardiaca con CEC.

5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el potencial antioxidante sistémico basal de pacientes sometidos a cirugía cardíaca con CEC.
- Caracterizar el potencial antioxidante sistémico de pacientes sometidos a cirugía cardíaca con CEC luego de recibir suplementación con esquema pre-acondicionante o placebo.
- Determinar la incidencia de FAPO en la población en estudio
- Determinar la asociación entre potencial antioxidante sistémico y el riesgo de desarrollar FAPO.

6. Métodos

Trabajo en marcha desde de 2007, en contexto de proyecto Fondecyt n° 1070948, responsabilidad del investigador Dr. Ramón Rodrigo Salinas. Título del proyecto Fondecyt: *“Prevención de la Fibrilación Auricular Post-operatoria: Caracterización Fisiopatológica de una Intervención Farmacológica Basada en un nuevo modelo de pre-acondicionamiento no hipóxico.”*

6.1 Diseño experimental

Ensayo clínico placebo-controlado, randomizado, doble ciego, en pacientes sometidos a cirugía cardíaca en el Centro Cardiovascular del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Hospital San José y Centro Cardiovascular del Hospital San Juan de Dios. Trabajo aprobado por los comités de ética de dichos hospitales y por los comités de ética del Servicio de Salud Metropolitano área norte y occidente. Aprobado también por el Comité de Ética de la investigación en seres humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. El estudio fue así mismo conducido de acuerdo a la declaración de Helsinki de la World Medical Association (2000).

6.1.1 Criterios de inclusión

Fueron randomizados para recibir suplemento o placebo pacientes previamente reclutados, con consentimiento informado firmado, previa realización de ECG de reposo y que cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

1. Edad entre 18 y 80 años.
2. Sometidos a cirugía cardíaca por cardiopatía no congénita.
3. Ritmo sinusal al momento de la randomización.

6.1.2 Criterios de exclusión

Así mismo fueron excluidos de participar pacientes que presentaron al momento de la randomización:

1. Historia previa de FA.
2. Cirugía cardiaca previa.
3. Ingesta de PUFA n-3, vitamina C o vitamina E un a menos de un mes del momento de la randomización.
4. Historia de uso de drogas antiarrítmicas.
5. Insuficiencia renal crónica (creatinemia > 2.0 mg/dl).
6. Insuficiencia hepática (bilirrubinemia > 3.0 mg/dl, albuminemia < 3.5g/dl o protrombinemia < 60% en ausencia de terapia anticoagulante oral o signos ecográficos de daño hepático crónico o presencia de várices esofágicas).
7. Embarazo.
8. Cardiopatía congénita.
9. Cirugía de urgencia

6.1.3 Protocolo de intervención

Los pacientes randomizados al grupo de suplementación recibieron, desde el séptimo día preoperatorio 2 g al día (1g c/12h) de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), en la relación 1:2. Al segundo día preoperatorio se añadieron 500 mg de vitamina C cada 12 horas y 400 UI de

vitamina E al día, manteniéndose este tratamiento completo hasta el alta. Los pacientes randomizados a placebo, recibieron el mismo número de cápsulas, de igual apariencia, pero conteniendo triglicérido caprílico/cáprico (825mg por cápsula), microgránulos inertes (500mg) y aceite vegetal en vez de PUFA n-3, vitamina C y vitamina E respectivamente (Figura 1). Todas las drogas fueron proporcionadas por los laboratorios Procaps (Colombia) y Gynopharm CRF (Chile).

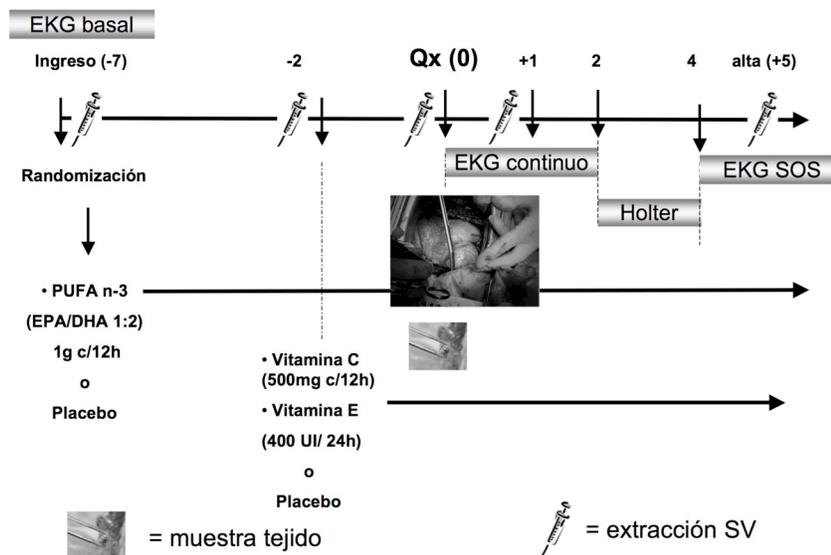


Figura 1. Esquema de protocolo de intervención.

6.1.4 Variables clínicas a considerar

Al momento de analizar los datos, se consideraron también los siguientes factores de riesgo y cardioprotectores, descritos con anterioridad para la

incidencia de FAPO. (Aranki *et al.*, 1996; Korantzopoulos *et al.*, 2007; Naccarelli *et al.*, 2007, Goette *et al.*, 2007).

- **Edad**
- **Sexo**
- **Índice de masa corporal (IMC)**

- **Comorbilidades médicas:**
 - hipertensión arterial
 - Diabetes mellitus
 - Dislipidemia
 - Tabaquismo

- **Tratamiento farmacológico crónico:**
 - Estatinas
 - Betabloqueadores
 - IECAs y/o ARAII
 - Aspirina

- **Antecedentes ecocardiográficos:**
 - Tamaño auricular
 - Disfunción sistólica

- **Distribución según tipo de cirugía:**
 - Coronarios

- Valvulópatas
- Mixtos

- **Tiempo de pinzamiento aórtico.**
- **Tiempo total en CEC.**
- **Uso de hemoderivados:**
 - Glóbulos rojos
 - Plasma fresco congelado (PFC)

6.1.5 Pesquisa del endpoint primario

Para la detección de la FAPO, los pacientes fueron mantenidos bajo monitorización electrocardiográfica continua durante la cirugía y en su posterior estadía en la unidad coronaria de cuidados intensivos. Previo a su alta de dicha unidad, se instaló un Holter-ECG, el cual se mantuvo hasta el cuarto día postoperatorio. Posterior al cuarto día, se realizó un ECG de 12-derivaciones en caso de presentar sintomatología clásica de arritmia. Así mismo, todo episodio arrítmico de más de un minuto de duración se objetivó con un ECG de 12-derivaciones.

6.1.6 Endpoints secundarios y técnicas utilizadas

Muestras de tejido auricular

Se obtuvieron muestras de tejido auricular de orejuela fueron recolectadas durante la cirugía, previo a la canulación para el establecimiento de CEC. Las muestras de aproximadamente 10x5x5mm fueron inmediatamente fraccionadas para las diversas técnicas y rápidamente congeladas en nitrógeno líquido para su posterior almacenaje definitivo a -80°C.

Muestras de sangre venosa

Se obtuvieron muestras de sangre venosa (16 ml) extraídas en Vacutainers® con EDTA disódico (1.5 mg ml⁻¹) al momento de la randomización (muestra -7), dos días previo a la cirugía (muestra -2), durante la intervención quirúrgica, previo a establecimiento de CEC (muestra 0), en el postoperatorio precoz, a las 6-8 h de postoperados (muestra +1) y al quinto día postoperatorio (muestra +5). Las muestras fueron centrifugadas para separar el plasma y los eritrocitos. Los eritrocitos fueron lavados con suero fisiológico frío (3 veces), seguido de un shock hipotónico con agua bidestilada y homogenización. Las muestras de plasma y hemolizados fueron almacenados en congelador a -80°C. El sobrenadante del hemolizado, para las técnicas de GSH/GSSG, GSH-Px y SOD se obtuvo por ultracentrifugación en frío a 33,000 g por 60 minutos.

Determinaciones de laboratorio e instrumentos utilizados

Se realizó centrifugación con equipo Heal Force® modelo Neo Furge 23R. Se cuantificó potencial antioxidante sistémico de estos pacientes por medio de mediciones espectrofotométricas con equipo Hewlett-Packard® modelo 8452A. Técnicas de Fluorimetría llevaron acabo con equipo Bio Rad® modelo Versa Fluor. Las determinaciones de HPLC se llevaron acabo con equipo detector de fluorescencia Waters™ 474, con controlador Waters 600 y bomba Waters 600.

Actividad de catalasa

Se determino actividad de catalasa en tejido miocárdico y eritrocito según técnica espectrofotométrica descrita por Aebi et al. (Aebi *et al.*, 1974).

Actividad de glutatión peroxidasa

Se determino la actividad de glutatión peroxidada (GSHpx) en tejido miocárdico y eritrocito según técnica espectrofotométrica descrita por Flohé y Gunzler (Flohe *et al.*, 1984).

Actividad de superóxido dismutasa

Las determinaciones de actividad de superóxido dismutasa (SOD) en tejido y eritrocito se llevaron acabo según técnica descrita por Nebot et al (Nebot *et al.*, 1993).

Capacidad antioxidante del plasma

Fue determinada por la técnica de ferric reducing ability of plasma (FRAP), según técnica espectrofotométrica descrita previamente por Benzie y Strain (Benzie *et al.*, 1996).

Relación de glutatión reducido-oxidado

El contenido de glutatión reducido (GSH) y de glutatión oxidado (GSSG) y la relación GSH/GSSG en tejido miocárdico y eritrocito se determinó por técnica fluorométrica según ha sido descrito previamente por Hissin et al (Hissin *et al.*, 1976).

Niveles plasmáticos de vitamina C

Las determinaciones de la concentración plasmática de vitamina C se realizaron por técnica fluorométrica (Chung *et al.*, 2001).

Marcadores de lipoperoxidación

Los niveles de lipoperoxidación en tejido miocárdico y plasma, por medición de niveles de malondialdehído fueron determinados por la técnica de HPLC con extracción sin solvente orgánico (Young and Trimble, 1991).

6.1.7 Análisis estadístico

La descripción estadística de variables se encuentra expresada como promedios \pm desviación estándar (DS). El efecto del tratamiento sobre la incidencia de FAPO será evaluado por medio de odds ratio. El riesgo acumulativo de ocurrencia de FAPO para cada grupo será estimado por el método de Kaplan-Meier. Las variables fueron sometidas a la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre variables continuas fueron evaluadas por medio del test de Student. Para estudiar asociaciones entre múltiples variables se aplicó un análisis multivariado de regresión logística (ANOVA), aplicándose posteriormente un análisis con test estadístico ad-hoc. Para estudiar diferencias entre variables categóricas se utilizó el test de Fisher. El análisis de las correlaciones encontradas se realizó de acuerdo al test de Spearman. Se consideró significancia estadística con un valor $p < 0.05$. Todos los tests realizados fueron de dos colas y llevados a cabo utilizando los softwares GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA y Microsoft Excel versión 2004, ambos para MacOS X.

7. Resultados

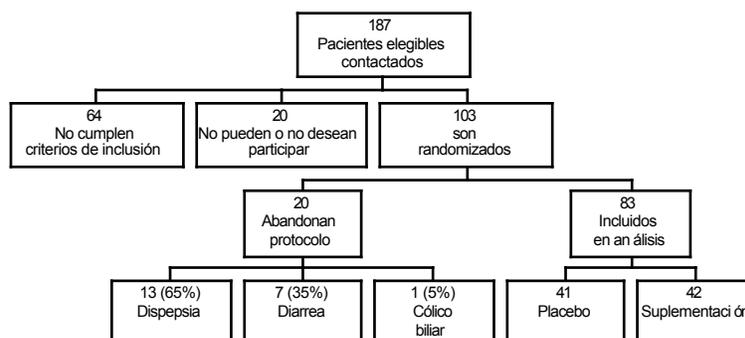


Figura 2. Diagrama de flujo de randomización de pacientes durante periodo julio 2007 a mayo 2009.

Variables	Placebo (n=41)	Suplemento (n=42)	Valor p
Demográficas			
Edad \pm DS	57.7 \pm 5.8	57.4 \pm 5.2	0.804
Sexo masculino	35 (85.4%)	36 (85.7%)	0.756
IMC \pm DS	26.3 \pm 3.2	27.1 \pm 5.2	0.399
Comorbilidades			
Hipertensión arterial	27 (65.8%)	22 (52.4%)	0.266
Diabetes mellitus	15 (36.6%)	17 (40.5%)	0.823
Dislipidemia	15 (36.6%)	18 (42.9%)	0.653
Tabaquismo	16 (39%)	19 (45.2%)	0.658
Tratamiento farmacológico crónico			
Aspirina	23 (56.1%)	25 (59.5%)	0.826
Atorvastatina	19 (46.3%)	18 (42.9%)	0.827
Otra estatina	5 (12.2%)	4 (9.5%)	0.738
iECA	23 (56.1%)	22 (52.4%)	0.827
ARAI	3 (7.1%)	2 (4.8%)	0.676
Betabloquadores	10 (24.4%)	11 (26.2%)	1.000
Quirúrgicas e intraoperatorias			
Coronarios	20 (48.8%)	25 (59.5%)	0.382
Valvulopatías	8 (19.5%)	10 (23.8%)	0.791
Mixtos	13 (31.7%)	7 (16.7%)	0.196
Uso de CEC	41 (100%)	42 (100%)	1.000
Tiempo de Clampeo, min	94.76 \pm 25.24	94.75 \pm 24.78	0.998
Tiempo en CEC, min	82.76 \pm 10.01	93.47 \pm 20.66	0.012*
Tamaño aurícula, cm	39.29 \pm 6.71	43.75 \pm 5.87	0.063
FEVI (%)	51.23 \pm 18.95	52.09 \pm 15.66	0.875
GR	1.71 \pm 1.92	1.64 \pm 2.06	0.928
PFC	0.57 \pm 1.45	0.64 \pm 1.36	0.896

Tabla 1. Distribución demográfica de la muestra, comorbilidades, tratamiento farmacológico crónico y variables quirúrgicas e intraoperatorias. IMC: Índice de masa corporal. iECA: inhibidores de enzima convertidora de angiotensina II. ARAII: Bloqueadores del receptor de angiotensina II. CEC: circulación extracorpórea. FEVI: fracción de eyección de ventrículo izquierdo. GR: glóbulos rojos. PFC: plasma fresco congelado. Expresados promedio \pm DS o número de casos. * $p < 0.05$ en comparación a placebo.

	FAPO (+)	FAPO (-)	Total
Suplemento	5 (11.9%)	37 (88.1%)	42
Placebo	17 (41.5%)	24 (58.5%)	41
Total	22 (26.5%)	61 (73.5%)	83

Tabla 2. Incidencia de FAPO en la población estudiada. Expresados como número absoluto y porcentaje del total.

Tabla analizada	
Riesgo de FAPO en suplementados	0.119
Riesgo de FAPO en placebo	0.415
Reducción riesgo absoluto	0.296
IC (95%)	0.116 - 0.475
Riesgo relativo (Recíproco)	0.287 (3.4)
IC (95%)	0.117 - 0.706
NNT	3.4
IC (95%)	2.1 - 8.6
Valor p (Test de Fisher)	0.0028

Tabla 3. Análisis estadístico del tratamiento en la población estudiada. Expresados como números absolutos. IC: intervalo de confianza. NNT: número necesario a tratar.

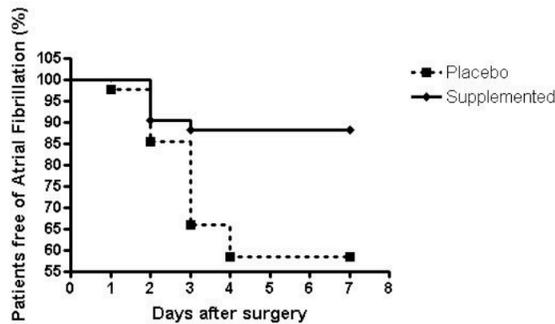


Figura 3. Gráfico de Kaplan-Meier ilustra población libre de fibrilación auricular tras seguimiento en pacientes en protocolo que recibieron placebo (línea punteada) y suplementación (línea continua). Log-rank test=0.0034

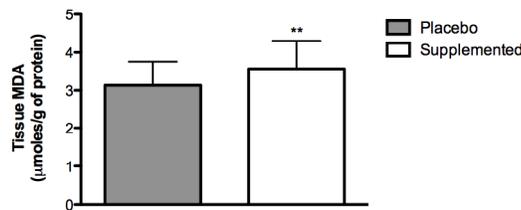


Figura 4. Niveles de malondialdehído (MDA) determinados en tejido atrial de pacientes sometidos a protocolo, bajo suplementación (barras blancas) o placebo (barras grises). Muestras obtenidas al momento de la cirugía previo a establecimiento de circulación extracorpórea. Resultados expresados como promedio \pm DS. ** $p < 0.005$ comparado a placebo.

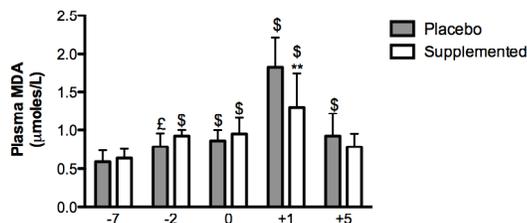


Figura 5. Lipoperoxidación determinada por niveles de malondialdehído (MDA) en plasma de pacientes sometidos a protocolo, bajo suplementación (barras blancas) o placebo (barras grises) al momento de la randomización (día -7), al iniciar suplementación con vitaminas antioxidantes o placebo (día -2), el día de la cirugía (día 0), postoperatorio precoz (día +1) y al alta (día +5). Resultados expresados como promedio \pm DS. ** $p < 0.001$ comparado a placebo; \$ $p < 0.0001$ comparado a basal; £ $p < 0.05$ comparado a basal.

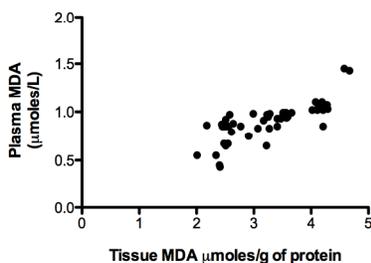


Figura 6. Correlación de Spearman entre niveles de malondialdehído (MDA) determinados en tejido atrial de pacientes sometidos a protocolo (eje x), obtenidos durante cirugía y valores de MDA determinados en plasma (día 0). Ambas determinaciones previas a establecimiento de circulación extracorpórea. Valores expresados como promedio. $(r) = 0.832$; $p < 0.0001$.

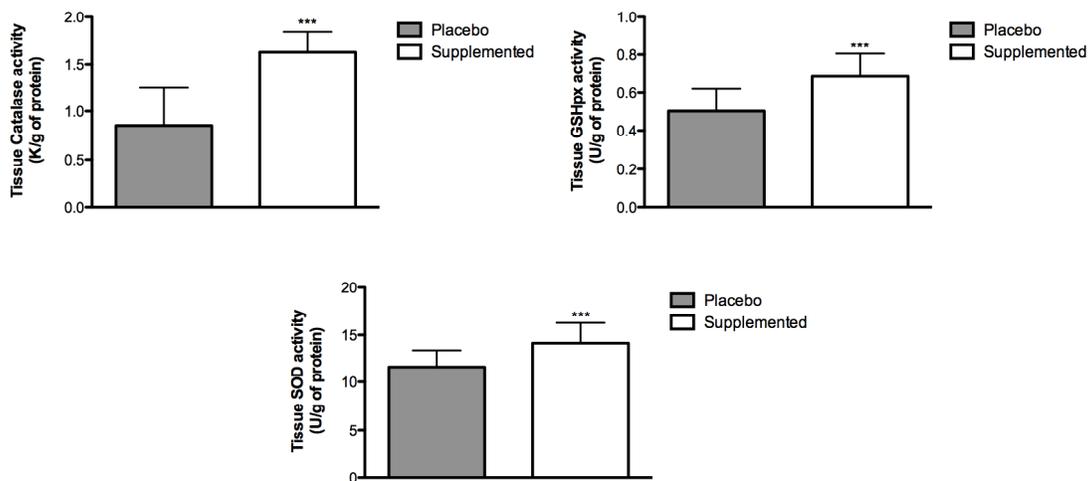


Figura 7. Actividad de las enzimas catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSHpx) y superóxido dismutasa (SOD) en tejido atrial de pacientes sometidos a protocolo, bajo suplementación (barras blancas) o placebo (barras grises). Muestras obtenidas al momento de la cirugía previo a establecimiento de circulación extracorpórea. Resultados expresados como promedio \pm DS. *** $p < 0.0005$ comparado a placebo.

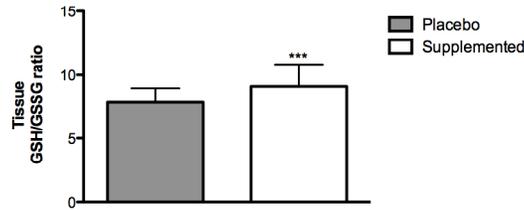


Figura 8. Relación glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en tejido atrial de pacientes sometidos a protocolo, bajo suplementación (barras blancas) o placebo (barras grises). Muestras obtenidas al momento de la cirugía previo a establecimiento de circulación extracorpórea. Resultados expresados como promedio \pm DS. *** $p < 0.0005$ comparado a placebo.

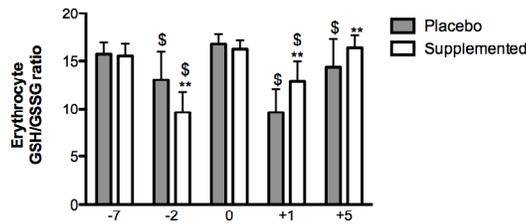


Figura 9. Relación glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en eritrocito de pacientes sometidos a protocolo, bajo suplementación (barras blancas) o placebo (barras grises) al momento de la randomización (día -7), al iniciar suplementación con vitaminas antioxidantes o placebo (día -2), el día de la cirugía (día 0), postoperatorio precoz (día +1) y al alta (día +5). Resultados expresados como promedio \pm DS. ** $p < 0.005$ en comparación a placebo; \$ $p < 0.0001$ en comparación a basal.

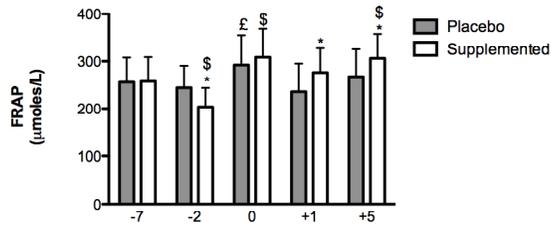


Figura 10. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) en pacientes sometidos a protocolo, bajo suplementación (barras blancas) o placebo (barras grises) al momento de la randomización (día -7), al iniciar suplementación con vitaminas antioxidantes o placebo (día -2), el día de la cirugía (día 0), postoperatorio precoz (día +1) y al alta (día +5). Resultados expresados como promedio \pm DS. * $p < 0.05$ comparado a placebo; \$ $p < 0.0001$ comparado a basal.

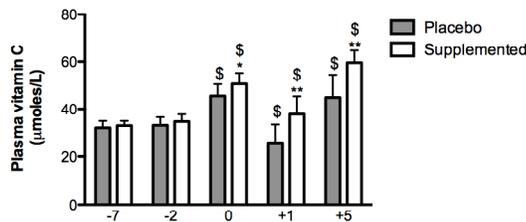


Figura 11. Niveles plasmáticos de vitamina C en pacientes sometidos a protocolo, tras suplementación (barras blancas) o placebo (barras negras), al momento de la randomización (día -7), al iniciar suplementación con vitaminas antioxidantes o placebo (día -2), el día de la cirugía (día 0), postoperatorio precoz (día +1) y al alta (día +5). Resultados expresados como promedio \pm DS. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ comparado a placebo; \$ $p < 0.0001$ comparado a basal.

7.1 Reclutamiento y seguimiento

El periodo de reclutamiento se llevó a cabo entre julio de 2007 a mayo de 2009 en los Centros de Enfermedades Cardiovasculares de los Hospitales Clínico de la Universidad de Chile y San José. Durante este tiempo, 64 pacientes no cumplieron los criterios de inclusión y 20 decidieron no participar por motivos personales. Veinte pacientes debieron abandonar el tratamiento por los siguientes efectos colaterales: 13 por dispepsia con olor a pescado (65%), 7 por diarrea (35%) y uno por dolor abdominal por cólico biliar (5%), ver figura 2. Todas las reacciones adversas cedieron al retirar el tratamiento, sin necesidad de intervenciones adicionales. No se presentaron complicaciones graves como hemorrágicas, infecciosas, cardiovasculares ni neurológicas de ningún tipo asociadas al tratamiento, durante el tiempo de seguimiento. Finalmente, un total de 83 pacientes randomizados (41 placebos y 42 suplementados) fueron incluidos en el análisis.

7.2 Sobre la muestra y sus características

La tabla 1 exhibe las características demográficas, comorbilidades, variables de laboratorio, tratamiento farmacológico crónico, variables quirúrgicas e intraoperatorias basales de la muestra en estudio. Podemos apreciar que no se observan diferencias estadísticamente significativas de estos parámetros entre los grupos, salvo en el tiempo de CEC. Se observa una diferencia de 11.46% en esta

variable, de significancia estadística ($p=0.012$). Sin embargo, el tiempo de pinzamiento aórtico, determinante del tiempo de isquemia miocárdica, no es distinto entre ambos grupos ($p=0.998$).

7.3 Endpoint primario

En la tabla 2 se observa que la incidencia de FAPO en la población estudiada fue 26.5% (22 de 83). Destaca que la incidencia de FAPO fue de 11.9% (5 de 42) en el grupo suplementado en comparación al 41.5% (17 de 41) observado en el grupo el grupo placebo (RR 0.29; IC 95%: 0.12 a 0.71; $p=0.0028$). En consecuencia, podemos apreciar en la tabla 3 que el número de pacientes necesarios a tratar (NNT) fue de 3.4 (IC 95%: 2.1 a 8.6). La figura 3 muestra un gráfico de Kaplan-Meier de la incidencia de POAF en la población estudiada. La arritmia se presentó en promedio a los 2.6 ± 0.8 días del postoperatorio en el grupo placebo y a los 2.5 ± 0.6 en el grupo suplementado ($p=0.73$). La duración promedio de la FA fue de 19.9 ± 15.3 h en el grupo placebo y de 11.5 ± 0.8 h en los pacientes suplementados ($p=0.13$). Síntomas atribuibles a FA fueron reportados por 4 de 5 (80%) pacientes en el grupo suplementado y 10 de 17 (58.8%) en el grupo placebo ($p=0.61$). La arritmia se trató inicialmente con amiodarona en 1 de 5 (20%) pacientes asignados a suplementación y 9 de 17 (52.9%) en el grupo placebo ($p=0.32$). Se realizó cardioversión eléctrica en un (20%) paciente recibiendo suplementación ($p=0.23$). Hubo conversión espontánea a ritmo sinusal sin intervención en dos pacientes suplementados (40%) y uno

(20%) del grupo placebo ($p=0.12$). No hubo recurrencia de la arritmia en ningún paciente después del primer episodio durante el periodo de seguimiento.

7.4 Endpoints secundarios

La figura 4 muestra niveles de lipoperoxidación determinados en tejido auricular obtenido al momento de la cirugía, previo establecimiento de circulación extracorpórea. Los niveles de MDA fueron 14.1% mayor en el grupo suplementado en comparación a placebo ($p=0.0047$). La figura 5 muestra lipoperoxidación determinada por niveles de MDA en plasma de pacientes sometidos a protocolo. Previamente pudimos apreciar (tabla 1) que el aporte de plasma exógeno (PFC) fue muy escaso y sin diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0.984$). Destaca en el postoperatorio temprano, (muestra +1) un aumento del 210% en los niveles de lipoperoxidación del grupo placebo en comparación a su basal ($p<0.001$). El grupo suplementado en cambio, exhibe un aumento del 106% en comparación a su respectivo basal ($p<0.001$). La correlación de Spearman entre los niveles de lipoperoxidación determinados en tejido auricular y plasma al momento de la cirugía se puede apreciar en la figura 6, observándose una relación directa entre ambas determinaciones. (Número de pares XY: 61; Spearman (r)=0.83; IC 95%: 0.73 a 0.89; $p<0.0001$).

El potencial antioxidante intracelular, representado por la actividad enzimática antioxidante en tejido auricular y la relación GSH/GSSG en tejido auricular y eritrocito se puede apreciar en las figuras 7, 8 y 9 respectivamente. La

actividad de las enzimas antioxidantes catalasa, SOD y GSHpx, determinada por técnica espectrofotométrica fue 90.6, 38.0 y 22.3% mayor que sus respectivos valores en el grupo placebo ($p < 0.0001$). En cuanto a la defensa antioxidante enzimática en eritrocito, no se observaron variaciones estadísticamente significativas (datos no publicados). La defensa antioxidante intracelular no enzimática representada por la relación GSH/GSSG en tejido auricular fue 16.7% mayor en el grupo suplementado en comparación a placebo ($p = 0.0006$). Así mismo, se observa en eritrocito que luego de 5 días de suplementación con PUFA n-3 (muestra -2), la relación GSH/GSSG en los suplementados fue 37.8% menor en comparación a su basal ($p < 0.001$). En el grupo placebo en cambio la caída fue de un 16.7% en comparación a su basal ($p < 0.001$). Al séptimo día de tratamiento, tras dos días de suplementación con vitaminas antioxidantes, no se observan diferencias entre las dos ramas de tratamiento (muestra 0: $p > 0.05$). En el postoperatorio temprano el grupo placebo exhibe una caída del 38.6% de la relación GSH/GSSG en comparación a su basal ($p < 0.0001$). En el grupo suplementado en cambio, la caída de la relación GSH/GSSG en el postoperatorio temprano fue de un 17.1% en comparación a su basal ($p < 0.0001$). Al momento del alta, el grupo suplementado no muestra diferencias en la relación GSH/GSSG en comparación a sus valores basales, mientras que el grupo placebo muestra niveles 8.3% menores a su basal ($p < 0.001$). No se encontró buena correlación entre la relación GSH/GSSG medida en tejido vs. sangre (datos no publicados).

El potencial antioxidante extracelular, representado por niveles de FRAP se encuentra ilustrado en la figura 10. Tras 5 días de exposición a PUFA n-3, el grupo

suplementado muestra una caída de 20.3% con respecto a su basal ($p < 0.0001$), mientras que placebo no muestra diferencias con respecto a sus niveles basales ($p > 0.05$). Tras dos días de suplementación con vitaminas antioxidantes (día 0), los niveles de FRAP son un 14.2% superiores a su basal en el grupo suplementado, sin que se observen diferencias significativas entre las dos ramas. En el postoperatorio precoz, los niveles de FRAP del grupo suplementado no son diferentes a su basal ($p > 0.05$), mientras que el grupo placebo exhibe niveles un 14.7% menores al grupo suplementado ($p < 0.05$). Al momento del alta, los niveles de FRAP en los suplementados fueron un 18.9% mayores en comparación a su basal ($p < 0.0001$), mientras que placebo no muestra diferencias con sus niveles basales ($p < 0.05$).

Los niveles de vitamina C determinados en plasma se ilustran en la figura 11. Al momento de la cirugía, tras dos días de tratamiento con vitaminas antioxidantes, se observa en el grupo suplementado niveles 53.8% mayores en comparación al basal, mientras que el grupo placebo muestra niveles 41.9% superiores a su basal ($p < 0.0001$). En el postoperatorio temprano se observa un aumento del 14.9% en comparación a niveles basales en el grupo suplementado ($p < 0.0001$). El grupo placebo, por el contrario exhibe una caída del 19.9% en comparación a su basal ($p < 0.0001$). Al momento del alta los niveles de vitamina C en el grupo suplementado fueron un 80.8% superiores a su basal, mientras que placebo muestra niveles 39.9% mayores a su basal ($p < 0.0001$).

8. Discusión

Este estudio prospectivo, randomizado, placebo-controlado analizó si es que la suplementación asociada de PUFA n-3 con las vitaminas antioxidantes C y E, administrado en esquema pre-acondicionante, siete días previo a cirugía cardiaca con circulación extracorpórea, sería exitoso en disminuir la incidencia de FAPO en la población estudiada, en comparación a placebo. En relación a esto, el hallazgo más importante de este trabajo, es que se observó una reducción del riesgo relativo de presentar FAPO del 71.3% atribuible a la suplementación en comparación a placebo ($p < 0.0028$). Previamente Carnes et al. administrando 2 g de ascorbato la noche previa a la cirugía, seguido de 500mg c/12 h por cinco días tras la cirugía, lograron una reducción del riesgo relativo en la incidencia de FAPO de 53.3% en comparación a control (Carnes *et al.*, 2001). Adicionalmente, el grupo de Calò demostró, en ensayo clínico randomizado que la suplementación con PUFA n-3, desde el quinto día preoperatorio hasta el alta, disminuye en un 54.4% el riesgo relativo de FAPO en comparación a control (Calò *et al.*, 2005). Sin embargo, estos hallazgos son novedosos al presentar el mayor beneficio clínico conocido a la fecha, en disminuir la incidencia de esta altamente prevalente complicación postoperatoria, por medio de la combinación de estas dos estrategias para la potenciación de mecanismos antioxidantes. Primero se logró establecer un estatus pro-oxidativo por medio de la suplementación con PUFA n-3 en esquema pre-acondicionante, 7 días antes de la cirugía, con el fin de inducir la defensa antioxidante sistémica. Posteriormente, se agregó el reforzamiento con las vitaminas antioxidantes C y E, 48 hrs. previo a la cirugía con el fin de alcanzar

niveles plasmáticos protectores al momento de la injuria oxidativa, con mínima contraposición al fenómeno pre-acondicionante previo.

En la tabla 1 podemos apreciar que los grupos son comparables y la única diferencia relevante entre ambos sería el recibir placebo o suplementación. No existen diferencias en cuanto a las variables quirúrgicas, la administración de estatinas, betabloqueadores ni otras drogas a las cuales se les ha atribuido un efecto antioxidante reconocido. Tampoco existen diferencias en cuanto a factores de riesgo basales para desarrollar FA, como lo es la edad o el tamaño auricular. Sólo se puede observar una diferencia discreta en el tiempo en bomba entre ambos grupos. Sin embargo, el tiempo de pinzamiento aórtico, determinante de la isquemia miocárdica, no es distinto entre las dos ramas ($p=0.998$). Se puede observar así también que ambos grupos evidencian niveles de potencial antioxidante sistémico equivalentes al momento de la randomización. Podemos apreciar que tras cinco días de suplementación con PUFA n-3 se logra establecer un estrés oxidativo suficiente para la inducción de mecanismos de defensa antioxidante, de la misma manera que se ha sido descrito con anterioridad (Nenseter *et al.*, 1996; Mori *et al.*, 2003). Esto fue evidenciable en una caída del FRAP y de la relación GSH/GSSG en sangre del grupo suplementado en comparación a placebo tras cinco días de tratamiento ($p<0.01$). Así mismo en tejido, podemos apreciar una lipoperoxidación de un 14.1% mayor de los suplementados en comparación a placebo ($p<0.005$). El establecimiento de este estrés oxidativo sería suficiente para explicar la inducción de las enzimas antioxidantes catalasa, GSHpx y SOD que se puede apreciar en tejido miocárdico

(figura 7). Estos datos son consecuentes con hallazgos previos en modelo animal, en los cuales se ha observado que la exposición a PUFA n-3 produce la inducción de las tres enzimas antioxidantes en tejido miocárdico (Jahangiri *et al.*, 2006). Estos cambios no lograron evidenciarse en la actividad de estas mismas enzimas medidas en eritrocito. Esto se explicaría porque estas células anucleadas, carecerían de la capacidad de responder con síntesis proteica frente a un estrés oxidativo como se ha descrito por medio de la estimulación de ARE's (antioxidant response elements) en la región del promotor del DNA, dependiente del factor de transcripción Nrf2 (Sun *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009). Podemos así mismo observar que tras siete días de tratamiento (dos con vitaminas antioxidantes), la lipoperoxidación en plasma, relación GSH/GSSG en sangre y FRAP no son distintas entre las dos ramas. Esto se podría explicar por la inducción de mecanismos antioxidantes secundaria al aporte de PUFA n-3, la suplementación con vitaminas antioxidantes o una combinación de ambos. Se puede apreciar que dos días de suplementación con vitaminas antioxidantes son eficaces en elevar los niveles plasmáticos de ascorbato, sin evitar el establecimiento de un estrés oxidativo en tejido, necesario para generar un pre-acondicionamiento. Así mismo, la suplementación con vitaminas antioxidantes atenúa significativamente la caída de los niveles de ascorbato en el postoperatorio temprano, relación que se mantiene hasta el alta. Cabe recalcar que el beneficio antioxidante otorgado por las vitaminas C y E pueden deberse no solo por medio de sus efectos de "scavenger" de ERO (Rodrigo *et al.*, 2008; Rodrigo *et al.*, 2009), sino que se ha visto además que ambas vitaminas pueden ejercer regulación hacia abajo de la actividad de NADPH oxidasa, fuente de ERO de gran importancia durante

isquemia-reperfusión y regulación hacia arriba de NOS endotelial (Ulker et al., 2003). Finalmente, podemos apreciar un gran aumento de la lipoperoxidación en plasma secundaria a la isquemia-reperfusión a que son sometidos los pacientes durante la cirugía, consecuente con lo que se ha descrito con anterioridad (Ochoa et al., 2003; Ferreira et al., 2003). El aumento de este marcador de injuria oxidativa es importantemente atenuado por la suplementación (figura 5). Estas observaciones se sustentan además en la buena correlación entre la lipoperoxidación determinada en tejido versus plasma (figura 6). Junto con esta menor lipoperoxidación en plasma, se observa también en el postoperatorio precoz, menor caída de la relación GSH/GSSG en sangre y FRAP, atribuible a la suplementación (figuras 9 y 10). Esta tendencia de menor depleción de la defensa antioxidante no enzimática y menor daño oxidativo y se mantiene hasta el alta.

Por tanto, podemos concluir que el tratamiento sería eficaz en prevenir de manera significativa la incidencia de la arritmia en la población estudiada. Así mismo, las determinaciones del potencial antioxidante en tejido y sangre sugieren el establecimiento de un estrés oxidativo suficiente para permitir la inducción de la defensa antioxidante, secundaria a la suplementación en esquema pre-acondicionante. Así mismo se observa que la injuria oxidativa secundaria a la isquemia-reperfusión sería importantemente atenuada por la suplementación. Con esto, podemos decir que la potenciación de mecanismos antioxidantes sería eficaz en prevenir el daño oxidativo por isquemia-reperfusión, la cual ha sido previamente vinculado a la patogénesis y perpetuación de la fibrilación auricular postoperatoria (Mihim et al., 2001; Cai et al., 2002; Nattel et al., 2002).

En cuanto a los efectos no deseados asociados al tratamiento, podemos decir que fueron de baja morbilidad. No se presentaron diferencias entre ambos grupos en cuanto a complicaciones severas como hemorrágicas, infecciosas, cardiovasculares ni neurológicas (datos no publicados). Los efectos no deseados más frecuentes fueron dispepsia con olor a pescado, diarrea y dolor abdominal, todos los cuales cedieron al discontinuar el tratamiento. Podemos decir, sin embargo, que pese a su relativa poca importancia médica, si generaron problemas relevantes de adherencia principalmente derivados principalmente de la dispepsia con olor a pescado que se puede producir por la suplementación con PUFA n-3. Esta fue de hecho la principal causa de abandono de tratamiento observada en durante el seguimiento. Tal vez se podría solucionar por medio nuevas formulaciones farmacéuticas como comprimidos recubiertos, los cuales podría mejorar importantemente estos síntomas y aumentar la adherencia a tratamiento sin aumentar en gran medida los costos. En cuanto a complicaciones mayores, se ha visto que es segura la aplicación perioperatoria de PUFA n-3 en dosis de hasta 2 g/d en cirugía cardíaca, sin que se haya observado mayores complicaciones hemorrágicas en comparación a placebo. Esto se muestra de acuerdo con experiencias previas que no muestran evidencia de un aumento del riesgo de sangrado clínicamente significativo en dosis aún mayores (Dyerberg & Bang, 1979; Calo *et al.*, 2005).

Omega-3 y modulación redox de canales iónicos

Si bien hasta la fecha la suplementación con PUFA n-3 en población general no ha evidenciado clínicamente cambios electrocardiográficos, incluidos intervalo QT corregido (QT_C) y duración de complejo QRS (Greelen *et al.*, 2002), no se descarta que esto si pueda observarse en poblaciones de mayor riesgo cardiovascular. Tampoco se ha podido comprobar que la suplementación con PUFA n-3 se asocie a cambios en la duración de onda P o los intervalos PQ, QRS, QT o QT_C en modelo animal (Da Cunha *et al.*, 2007). La duración del periodo refractario efectivo (ERP) tampoco se modificó por la suplementación en animales en ritmo sinusal. Sin embargo, en perros sometidos a modelo de FA por electroestimulación, la suplementación con PUFA n-3 disminuyó significativamente el acortamiento del ERP auricular (Da Cunha *et al.*, 2007). Se piensa que la reducción ERP es un evento temprano en la patogénesis de la FA que genera un círculo de retroalimentación positiva que lleva a la auto-perpetuación de la AF (Wijffels *et al.*, 1995). Gran parte de las arritmias cardiacas emergen de la inestabilidad eléctrica inducida por la isquemia. La hipofunción de la Na^+/K^+ ATPasa lleva a un potencial de reposo más positivo, disminuyendo el umbral del potencial de acción. De esta manera, la célula se hace más vulnerable a la activación por estímulos menores. Se piensa que los PUFA n-3 actúan en la vía final de la excitación, principalmente a través de la inhibición de canales de sodio sensibles a voltaje y canales de Calcio tipo-L previniendo la sobrecarga de calcio que gatilla la activación (Reiffeld & MacDonald, 2006). La disminución de la corriente de calcio en la AF contribuye a la pérdida del plateau del potencial de

acción y acortamiento del ERP que facilita la actividad de reentrada (Van Wagoner, 2008). Existen buena evidencia de la de la presencia de modulación redox sobre la función de canales de Ca^+ y otros múltiples canales iónicos expresados en la aurícula, que participan en la patogénesis de la FA (Van Wagoner, 2008). Posiblemente, esto sea mediado por modificación redox directa sobre cisteínas en proteínas del canal, aunque la influencia redox sobre proteínas regulatorias no se puede descartar (Hool, 2009). Es posible que la regulación hacia abajo de canales de Ca^+ tipo-L durante la isquemia provea un rol adaptativo previniendo arritmias (Hool, 2009). Probablemente el preconditionamiento con PUFA n-3 tenga este efecto, al prevenir la violenta sobrecarga de Ca^+ asociada a la isquemia-reperusión. El sitio de acción primario de los PUFA n-3 está aun por determinarse. Se ha visto que los PUFA n-3 no se unen directamente a proteínas específicas de canales iónicos o que cambien la su conformación transmembrana (Reiffeld & MacDonald, 2006). Existe sin embargo evidencia de que la suplementación con PUFA n-3 eleva, al menos inicialmente, los niveles de estrés oxidativo sistémico dada la susceptibilidad de estos compuestos altamente insaturados a la peroxidación (Nenseter *et al.*, 1996). Adicionalmente, se ha comprobado que la suplementación PUFA n-3 se incorpora rápidamente a las membranas celulares y se ha relacionado de forma dosis-dependiente (índice Omega-3) con el riesgo de muerte por causas cardiovasculares (Harris & von Schacky, 2004).

Inflamación y fibrilación auricular

Esta descrito que durante la cirugía cardiaca se produce un gran aumento de marcadores inflamatorios como proteína C reactiva, interleuquinas pro-inflamatorias que estarían jugando un rol en la patogénesis de la FAPO. Consecuentemente se ha visto que el uso de corticoides sistémicos se ha mostrado promisorio en la prevención de la arritmia (Anselmi *et al.*, 2009). Se ha podido apreciar *in vitro*, que los PUFA n-3 disminuyen la producción de leucotrienos y citokinas pro-inflamatorias (Calder, 2009). Sin embargo, el mecanismo por el cual la inflamación participaría en la patogénesis de la FAPO no ha sido caracterizado. El tamaño auricular se considera un predictor del riesgo de desarrollar FA (Matthew *et al.*, 2004). Así mismo, se ha visto el aumento de presión y/o dilatación auricular puede gatillar FA en modelo animal (Ravelli & Allessie, 1997). De esta manera, la inflamación postoperatoria podría alterar de manera subaguda el aparato excito-conductor cardiaco y llevar a la generación de FA. Recientemente se ha demostrado también que corrientes aniónicas inducidas por distensión y corrientes catiónicas están funcionalmente presentes en cardiomiocitos de las principales venas pulmonares de conejos y que podrían tener un rol fisiopatológico en el desarrollo de FA bajo condiciones de estiramiento (Seol *et al.*, 2008).

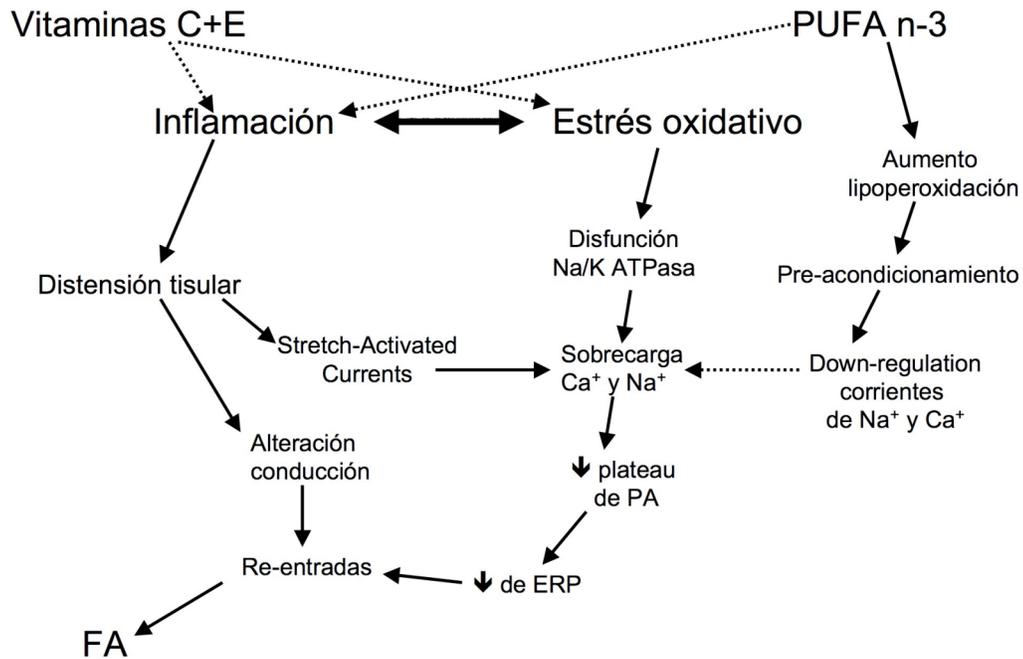


Figura 12. Modelo propuesto. La injuria generada por la isquemia-reperfusión establece un estrés oxidativo masivo e inflamación los cuales se potencian y perpetúan. La inflamación produciría distensión tisular la cual activaría canales catiónicos sensibles a distensión y alteraciones de la conducción. Por su parte el estrés oxidativo produciría disfunción de la Na^+/K^+ ATPasa, la cual llevaría a una sobrecarga de Ca^{2+} y Na^+ en la célula. Esto contribuiría a la disminución del plateau del potencial de acción y acortamiento del ERP que llevarían a su vez a la generación de re-entradas, mecanismo común en la patogénesis de la FA. Los PUFA n-3 y vitaminas C+E estarían actuando ambos a través de mecanismos antioxidantes y antiinflamatorios.

10. Proyecciones y comentarios finales

Los pacientes sometidos a cirugía cardiaca con CEC son llevados al pabellón quirúrgico, en promedio, en la sexta década de la vida. Por lo general son portadores de más de una de las enfermedades a las que se ha asociado un estrés oxidativo aumentado como lo son la HTA y diabetes. (Rodrigo, Bächeler *et al.*, 2007; Martín-Gallán *et al.*, 2007; Mahajan *et al.*, 2007). A estos se suma el fenómeno inevitable de isquemia-reperfusión durante la cirugía, el cual lleva a un desbalance de su estado redox sistémico en favor de una condición altamente pro-oxidante. Este daño oxidativo se ha vinculado a la patogénesis de múltiples complicaciones, siendo la más frecuente de ellas, la fibrilación auricular postoperatoria. La FA es la arritmia sostenida más frecuente en la población general, siendo un factor independiente de morbilidad y mortalidad (Da Cunha *et al.*, 2007). A pesar de esto, pocos de los tratamientos actualmente disponibles están destinados a disminuir las complicaciones asociadas a la FA, en vez de prevenir sus causas (Morillo *et al.*, 1995). Sabemos que la FA fomenta procesos de remodelación miocárdica que perpetúan la arritmia. (Morillo *et al.*, 1995; Issac *et al.*, 2007). Por eso, un tratamiento profiláctico que ataque la fuente del problema se presenta muy atractivo. Aunque actualmente se conoce la asociación entre daño por estrés oxidativo y FAPO, se hace indispensable seguir indagando sobre sus mecanismos subyacentes.

Los resultados obtenidos avalan la implementación a mayor escala de un tratamiento que se ha demostrado de sencilla administración (vía oral), bajo

costo y con mínimas reacciones adversas a medicamentos. De esta manera se espera aportar con una nueva terapia, segura, aplicable en la práctica clínica habitual. Esperamos así mismo que tenga un alto impacto en la disminución de la morbilidad, costos y prolongación de la hospitalización asociados a un problema de tan alta prevalencia.

10. Referencias

1. Aebi H. (1974) Catalase. In: *Methods in Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HU (Ed.). 29th ed. Academic Press, New York 673-678.
2. Adler A, Messina E, Sherman B, Wang Z, Huang H, Linke A, Hintze TH (2003). NAD(P)H oxidase-generated superoxide anion accounts for reduced control of myocardial O₂ consumption by NO in old Fischer 344 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H1015-1022.
3. Amar D, Zhang H, Miodownik S, Kadish AH (2003). Competing autonomic mechanisms precede the onset of postoperative atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 42:1262-1268.
4. Anselmi A, Possati G, Gaudino M (2009). Postoperative inflammatory reaction and atrial fibrillation: simple correlation or causation? *Ann Thorac Surg* 88:326-333.
5. Aranki SF, Shaw DP, Adams DH, Rizzo RJ, Couper GS, VanderVliet M, Collins JJ Jr, Cohn LH, Burstin HR (1996). Predictors of atrial fibrillation after coronary artery surgery. Current trends and impact on hospital resources. *Circulation* 94:390-397.
6. Becker LB (2004). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 15:461-470.
7. Benzie IFF and Strain JJ (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76.
8. Brundel BJ, Henning RH, Kampinga HH, Van Gelder IC, Crijns HJ (2002). Molecular mechanisms of remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 54:315-324.
9. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM (1989). Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 30:757-761.
10. Cai H, Griendling KK, Harrison DG (2003). Vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 24:471-478.
11. Calder PC (2009). Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* 91:791-795.
12. Calò L, Bianconi L, Colivicchi F, Lamberti F, Loricchio ML, de Ruvo E, Meo A, Pandozi C, Staibano M, Santini M (2005). N-3 Fatty acids for the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 45:1723-1728.
13. Carnes CA, Chung MK, Nakayama T, Nakayama H, Baliga RS, Piao S, Kanderian A, Pavia S, Hamlin RL, McCarthy PM, Bauer JA, Van Wagoner DR (2001). Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ Res* 89:E32-38.
14. Chen YJ, Chen SA (2006). Electrophysiology of pulmonary veins. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17:220-224.
15. Chung WY, Chung JK, Szeto YT, Tomlinson B, Benzie IF (2001). Plasma ascorbic acid: measurement, stability and clinical utility revisited. *Clin Biochem* 34:623-627.

16. Da Cunha DN, Hamlin RL, Billman GE, Carnes CA (2007). n-3 (omega-3) polyunsaturated fatty acids prevent acute atrial electrophysiological remodeling. *Br J Pharmacol* 150:281-285.
17. De Vecchi E, Pala MG, Di Credico G, Agape V, Paolini G, Bonini PA, Grossi A, Paroni R (1998). Relation between left ventricular function and oxidative stress in patients undergoing bypass surgery. *Heart* 79:242-247.
18. Domenech RJ (2006). Preconditioning: a new concept about the benefit of exercise. *Circulation* 113:e1-3.
19. Dyerberg J, Bang HO (1979). Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet* 2:433-435.
20. Eslami M, Badkoubeh RS, Mousavi M, Radmehr H, Salehi M, Tavakoli N, Avadi MR (2007). Oral ascorbic acid in combination with beta-blockers is more effective than beta-blockers alone in the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. *Tex Heart Inst J* 34:268-274.
21. Falk RH (2001). Atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 344:1067-78.
22. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF (2007). Interaction of Cardiovascular Risk Factors with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning. *Pharmacol Rev* 59:418-458.
23. Ferreira R, Fraga C, Carrasquedo F, Hourquebie H, Grana D, Milei J (2003). Comparison between warm blood and crystalloid cardioplegia during open heart surgery. *Int J Cardiol* 90:253-260.
24. Flohé L and Günzler WA (1984). Assays of glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology*. Colowic SP and Kaplan NO (Ed.). Academic Press, New York 114-121.
25. Fynn SP, Kalman JM (2004). Pulmonary veins: anatomy, electrophysiology, tachycardia, and fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol*. 27:1547-1559.
26. Goette A, Lendeckel U (2004). Nonchannel drug targets in atrial fibrillation. *Pharmacol Ther* 102:17-36.
27. Geelen A, Brouwer IA, Zock PL, Kors JA, Swenne CA, Katan MB, Schouten EG (2002). (n-3) Fatty acids do not affect electrocardiographic characteristics of healthy men and women. *J Nutr* 132:3051–3054.
28. Guney M, Oral B, Demirin H, Karahan N, Mungan T, Delibas N (2007). Protective effects of vitamins C and E against endometrial damage and oxidative stress in fluoride intoxication. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:467–474.
29. Harris WS, Von Schacky C (2004). The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med* 39:212-20.
30. He X, Kan H, Cai L, Ma Q (2009). Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 46:47-58.
31. Hissin PJ and Hilf R (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry* 74: 214-226.

32. Hogue CW Jr, Hyder ML (2000). Atrial fibrillation after cardiac operation: risks, mechanisms, and treatment. *Ann Thorac Surg* 69:300-306.
33. Hohnloser SH (1998). Can we predict atrial fibrillation after coronary surgery and why should we? *Eur Heart J* 19:684-685.
34. Hool LC (2009). The L-type Ca(2+) channel as a potential mediator of pathology during alterations in cellular redox state. *Heart Lung Circ* 18:3-10.
35. Howard PA, Barnes BJ (2008). Potential Use of Statins to Prevent Atrial Fibrillation After Coronary Artery Bypass Surgery. *Ann Pharmacother* 42:253-258.
36. Issac TT, Dokainish H, Lakkis NM (2007). Role of inflammation in initiation and perpetuation of atrial fibrillation: a systematic review of the published data. *J Am Coll Cardiol* 50:2021-2028.
37. Jahangiri A, Leifert WR, Kind KL, McMurchie EJ (2006). Dietary fish oil alters cardiomyocyte Ca²⁺ dynamics and antioxidant status. *Free Radic Biol Med* 40:1592-1602.
38. Jalife J (2003). Experimental and clinical AF mechanisms: bridging the divide. *J Interv Card Electrophysiol* 9:85-92.
39. Jensen TJ, Haarbo J, Pehrson SM, Thomsen B (2004). Impact of premature atrial contractions in atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 27:447-452.
40. Kawano S, Kubota T, Monden Y, Tsutsumi T, Inoue T, Kawamura N, Tsutsui H, Sunagawa K (2006). Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H1337-1344.
41. Korantzopoulos P, Kolettis TM, Galaris D, Goudevenos JA (2007). The role of oxidative stress in the pathogenesis and perpetuation of atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 115:135-143.
42. Korantzopoulos P, Kolettis TM, Kountouris E, Dimitroula V, Karanikis P, Pappa E, Siogas K, Goudevenos JA (2005). Oral vitamin C administration reduces early recurrence rates after electrical cardioversion of persistent atrial fibrillation and attenuates associated inflammation. *Int J Cardiol* 102:321-326.
43. Lamm G, Auer J, Weber T, Berent R, Ng C, Eber B. Postoperative white blood cell count predicts atrial fibrillation after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2006. 20:51-56.
44. Leaf A, Albert CM, Josephson M, Steinhaus D, Kluger J, Kang JX, Cox B, Zhang H, Schoenfeld D (2005). Fatty Acid Antiarrhythmia Trial Investigators. Prevention of fatal arrhythmias in high-risk subjects by fish oil n-3 fatty acid intake. *Circulation* 112:2762-2768.
45. London B, Albert C, Anderson ME, Giles WR, Van Wagoner DR, Balk E, Billman GE, Chung M, Lands W, Leaf A, McAnulty J, Martens JR, Costello RB, Lathrop DA (2007). Omega-3 fatty acids and cardiac arrhythmias: prior studies and recommendations for future research: a report from the National Heart, Lung, and Blood Institute and Office Of Dietary Supplements Omega-3 Fatty Acids and their Role in Cardiac Arrhythmogenesis Workshop. *Circulation* 116:e320-335.
46. Mahajan AS, Babbar R, Kansal N, Agarwal SK, Ray PC (2007). Antihypertensive and antioxidant action of amlodipine and vitamin C in patients of essential hypertension. *J Clin Biochem Nutr* 40:141-147.

47. Marchioli R, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di Gregorio D, Di Mascio R, Franzosi MG, Geraci E, Levantesi G, Maggioni AP, Mantini L, Marfisi RM, Mastrogiuseppe G, Mininni N, Nicolosi GL, Santini M, Schweiger C, Tavazzi L, Tognoni G, Tucci C, Valagussa F; GISSI-Prevenzione Investigators (2002). Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* 105:1897-1903.
48. Martín-Gallán P, Carrascosa A, Gussinyé M, Domínguez C (2007). Changes in oxidant-antioxidant status in young diabetic patients from clinical onset onwards. *J Cell Mol Med* 11:1352-1366.
49. Matata BM, Sosnowski AW, Galiñanes M (2000). Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. *Ann Thorac Surg.* 69:785-791.
50. Mathew JP, Fontes ML, Tudor IC, et al (2004). A multicenter risk index for atrial fibrillation after cardiac surgery. *JAMA* 291:1720 –1729.
51. Mori TA, Woodman RJ, Burke V, Puddey IB, Croft KD, Beilin LJ (2003). Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. *Free Radic Biol Med* 35:772-781.
52. Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM (1995). Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* 9:1588-1595.
53. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124 –1136.
54. Naccarelli GV, Wolbrette DL, Samii S, Banchs JE, Penny-Peterson E, Gonzalez MD (2007). New antiarrhythmic treatment of atrial fibrillation. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 5:707-714.
55. Nebot C, Moutet M, Huet P, Xu JZ, Yadan JC, Chaudiere J (1993). Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Anal Biochem.* 214:442-451.
56. Nenseter MS, Drevon CA (1996). Dietary polyunsaturates and peroxidation of low density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 7:8-13.
57. Newaz MA, Yousefipour Z, Nawal NN (2005). 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* 6:497–508
58. Ochoa JJ, Vilchez MJ, Mataix J, Ibáñez-Quiles S, Palacios MA, Muñoz-Hoyos A. Oxidative stress in patients undergoing cardiac surgery: comparative study of revascularization and valve replacement procedures. *J Surg Res.* 2003;111:248-254.
59. Olshansky B (2005). Interrelationships between the autonomic nervous system and atrial fibrillation. *Prog Cardiovasc Dis* 48:57-78.
60. Pignatelli P, Sanguigni V, Paola SG, Lo Coco E, Lenti L, Violi F (2005). Vitamin C inhibits platelet expression of CD40 ligand. *Free Radic Biol Med* 38:1662–1666.
61. Ramlawi B, Otu H, Mieno S, Boodhwani M, Sodha NR, Clements RT, Bianchi C, Sellke FW (2007). Oxidative stress and atrial fibrillation after cardiac surgery: a case-control study. *Ann Thorac Surg.* 84:1166-1172.

62. Ravelli F, Allessie M (1997). Effects of atrial dilatation on refractory period and vulnerability to atrial fibrillation in the isolated Langendorff-perfused rabbit heart. *Circulation* 96:1686–1695.
63. Reiffel JA, McDonald A (2006). Antiarrhythmic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol* 98:50i-60i.
64. Rodrigo R, Bächler JP, Araya J, Prat H, Passalacqua W (2007). Relationship between (Na + K)-ATPase activity, lipid peroxidation and fatty acid profile in erythrocytes of hypertensive and normotensive subjects. *Mol Cell Biochem* 303:73-81.
65. Rodrigo R, Castillo R, Cereceda M, Asenjo R, Zamorano J, Araya J (2007). Non-hypoxic preconditioning of myocardium against postoperative atrial fibrillation: Mechanism based on enhancement of the antioxidant defense system. *Med Hypotheses* 69:1242-1248.
66. Rodrigo R, Cereceda M, Castillo R, Asenjo R, Zamorano J, Araya J, Castillo-Koch R, Espinoza J, Larraín E (2008). Prevention of atrial fibrillation following cardiac surgery: basis for a novel therapeutic strategy based on non-hypoxic myocardial preconditioning. *Pharmacol Ther* 118:104-127.
67. Rodrigo R, Vinay J, Castillo R, Cereceda M, Asenjo R, Zamorano J, Araya J, Castillo-Koch R, Espinoza J, Larraín E (2009). Use of vitamins C and E as a prophylactic therapy to prevent postoperative atrial fibrillation. *Int J Cardiol* [Epub ahead of print].
68. Seol CA, Kim WT, Ha JM, Choe H, Jang YJ, Youm JB, Earm YE, Leem CH (2008). Stretch-activated currents in cardiomyocytes isolated from rabbit pulmonary veins. *Prog Biophys Mol Biol* 97:217-231.
69. Shiroshita-Takeshita A, Schram G, Lavoie J, Nattel S (2004). Effect of simvastatin and antioxidant vitamins on atrial fibrillation promotion by atrial-tachycardia remodeling in dogs. *Circulation* 110:2313-2319.
70. Solimano CG, Mazzei PM (2007). Which are the causes of death among Chileans today?: Long-term perspectives. *Rev Med Chil* 135:932-938.
71. Sowell AL, Huff DL, Yeager PR, Caudill SP, Gunter EW (1994). Retinol, alpha-tocopherol, lutein/zeaxanthin, beta-cryptoxanthin, lycopene, alpha-carotene, trans-beta-carotene, and four retinyl esters in serum determined simultaneously by reversed-phase HPLC with multiwavelength detection. *Clin Chem* 40:411-416.
72. Sun Z, Chin YE, Zhang DD (2009). Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Mol Cell Biol* 29:2658-2672.
73. Tziomalos K, Athyros VG, Mikhailidis DP (2007). Fish oils and vascular disease prevention: an update. *Curr Med Chem* 14:2622-2628.
74. Ulker S, McKeown PP, Bayraktutan U (2003). Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension* 41:534–539.
75. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84.

76. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT (1998). Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273:18092-18098.
77. Van Wagoner DR (2008). Oxidative stress and inflammation in atrial fibrillation: role in pathogenesis and potential as a therapeutic target. *J Cardiovasc Pharmacol* 52:306-13.
78. Villareal RP, Hariharan R, Liu BC, Kar B, Lee VV, Elayda M, Lopez JA, Rasekh A, Wilson JM, Massumi A (2004). Postoperative atrial fibrillation and mortality after coronary artery bypass surgery. *J Am Coll Cardiol* 43:742-748.
79. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA (1995). Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 92: 1954–1968.
80. Wu ZK, Iivainen T, Pehkonen E, Laurikka J, Zhang S, Tarkka MR (2003). Fibrillation in patients subjected to coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126:1477-1482.
81. Yellon DM and Hausenloy DJ (2007). Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med* 357:1121-1135.
82. Yogaratnam JZ, Laden G, Madden LA, Seymour AM, Guvendik L, Cowen M, Greenman J, Cale A, Griffin S (2006). Hyperbaric oxygen: a new drug in myocardial revascularization and protection? *Cardiovasc Revasc Med* 7:146-154.
83. Young IS and Trimble ER (1991). Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann Clin Biochem* 28:504-508.