



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA

**“RELACIÓN ENTRE BIOMARCADORES DE ESTRÉS
OXIDATIVO Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y
FUNCIONALES DEL CORAZÓN EN PACIENTES CON
INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO SOMETIDOS A
ANGIOPLASTÍA Y TRATAMIENTO CON VITAMINAS
ANTIOXIDANTES”**

NICOLÁS VALLS JIMÉNEZ

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOPATOLOGÍA

Director de Tesis: Dr. Ramón Rodrigo Salinas

**Co-Tutores de Tesis: Dr. Juan Carlos Prieto Domínguez
Dr. Cristóbal Ramos Gómez**

Fuente de financiamiento: Proyecto FONDECYT 1120594

2016

**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 Magister presentada por el candidato

NICOLÁS ALEJANDRO VALLS JIMÉNEZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Fisiopatología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 27 de Enero de 2016

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

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Gladys Tapia

Prof. Dr. Virgina Fernández

**Prof. Dra. Gina Sánchez
Presidente Comisión**

Dedico la totalidad de mi trabajo a mi familia, por su apoyo incondicional y por motivarme a seguir pese a las dificultades del camino. A mis padres Gonzalo y Elisa, a mis hermanos Cristian, Montserrat y Tomás, y a mi compañera de vida Carolina.

Agradecimientos.

Agradezco de todo corazón en primer lugar a mi director de tesis Profesor Ramón Rodrigo por su apoyo constante, por cada enseñanza entregada durante este periodo, además de motivarme a seguir y permanecer en el camino de la ciencia. También agradezco el apoyo del Dr. Juan Carlos Prieto, Dr. Cristóbal Ramos y Dr. Rubén Aguayo por su fundamental ayuda clínica, ya que sin ella el desarrollo de esta tesis no podría haber sido llevada a cabo. Especialmente agradezco también al Dr. Juan Guillermo Gormaz quien desinteresadamente se me brindó su apoyo y consejo para el desarrollo de mi tesis. Además quiero reconocer la ayuda, el ánimo y la alegría a Diego Soto y Juan Pinto quienes son parte fundamental del día a día del trabajo en el laboratorio. Finalmente, quiero agradecer la ayuda de mis compañeros Alfredo Aliaga, Jaime González, Roberto Brito, Caterina Contreras y Matías Libuy quienes de una u otra forma, con su trabajo y consejos, han sido parte del desarrollo de este trabajo.

Índice

Agradecimientos	4
Resumen	6
Introducción	8
Hipótesis	11
Objetivos:	11
Objetivo General:.....	11
Objetivos Específicos:.....	11
Metodología	12
Análisis estadístico	14
Resultados	16
Parámetros de función cardiaca:	17
Evaluación morfológica cardiaca:	19
Parámetros bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo, marcadores de inflamación y de daño miocárdico:	20
Discusión	24
Referencias	31

Resumen

Marco teórico: La angioplastia coronaria percutánea (ACP) ha demostrado ser de gran utilidad para reducir la mortalidad morbilidad y el pronóstico de los pacientes que sufren un infarto agudo miocárdico (IAM). Sin embargo, este procedimiento paradójicamente puede aumentar el daño original del IAM en una condición conocida como "daño por reperfusión miocárdica" (DRM). El estrés oxidativo puede tener una contribución preponderante en el mecanismo de esta lesión. Es por esto que la administración endovenosa de vitamina C en conjunto a vitamina E oral durante el periodo inmediatamente posterior al infarto, podría contribuir a una mejoría en los parámetros funcionales y morfológicos cardiacos, y al estado antioxidante sanguíneo

Objetivo: El presente estudio está dirigido a determinar los efectos de la administración de vitaminas C y E sobre las características morfológicas y funcionales del corazón, además de los biomarcadores relacionados con estrés oxidativo, en pacientes que luego de sufrir un IAM que han sido sometido a ACP.

Metodología: El protocolo de estudio consistió en un ensayo clínico aleatorizado controlado por placebo. En los sujetos asignados al grupo de tratamiento antioxidante el protocolo se inició mediante la administración oral de una dosis única de la vitamina E como α -tocoferol (800 UI) en conjunto a una infusión intravenosa de vitamina C como ascorbato de sodio (320 mM), seguido por un tratamiento oral con vitaminas C (500 mg/12hrs) más vitamina C (400 UI /día) durante 3 meses. Para los sujetos asignados al grupo control, las dosis orales de vitamina E y C fueron reemplazadas por cápsulas de aceite vegetal y almidón de maíz respectivamente, mientras que la infusión de vitamina C fue reemplazada por una solución salina de volumen y osmolaridad igual a la administrada en los pacientes tratados. La función cardiaca medida a través de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) y morfología cardiaca fueron determinadas mediante resonancia magnética cardiaca en los días 6 y 84 días posteriores al IAM. La función microvascular se evaluó mediante el grado de perfusión miocárdica TIMI (TMPG) medida en la angiografía. Se analizaron distintos parámetros bioquímicos relacionados a estrés oxidativo en eritrocitos y plasma: 8-Isoprostanos, Malondialdehído, Capacidad antioxidante plasmática,

Glutación reducido (GSH), Glutación oxidado (GSSG) e Índice Tiólico (GSH/GSSG) durante diferentes momentos del protocolo.

Resultados: La población de estudio constó de 54 pacientes, dentro de los cuales no se encontraron diferencias basales entre los grupos. Se observó al analizar la evolución de la FEVI de cada paciente, comparando el día 84 con el día 6, una evolución positiva en el grupo tratado, hecho que no se presentó en el grupo control. De forma similar, el cambio en el volumen expulsivo, comparando el día 84 con el día 6 mostró también resultados favorables en el grupo tratado, con una diferencia neta entre ambos grupos de alrededor de 10 ml/m². Adicionalmente, el grupo que recibió el tratamiento presentó una menor disfunción microvascular, evaluada tras la reperfusión. Estos datos son consistentes con un efecto protector de la función cardiaca, por parte de la administración de altos niveles de ascorbato en contra del daño por reperfusión en pacientes sometidos a ACP luego del IAM. Sin embargo, debido a los resultados discordantes obtenidos entre los biomarcadores de daño relacionado a estrés oxidativo, queda claro la necesidad de más estudios para determinar el mecanismo responsable que da cuenta de los resultados positivos observados en la función cardiaca.

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares constituyen el principal problema de salud en adultos. Durante las últimas décadas el infarto agudo miocárdico (IAM) ha sido la primera causa de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud, el IAM por sí solo representa el 13,4% de la mortalidad en todo el mundo [WHO, 2014].

El IAM con supradesnivel del segmento ST (SDST) se produce cuando existe isquemia profunda y prolongada en el tejido miocárdico producto de la oclusión de los vasos de la circulación coronaria, produciendo daño y muerte celular [Braunwald E. 1989]. Por este motivo, la restauración del flujo sanguíneo coronario es el objetivo primordial en el tratamiento del IAM. Durante las últimas décadas ha habido una disminución en su mortalidad debido a los avances en el diagnóstico y manejo del IAM con SDST [Roger et al., 2011] lo que ha sido posible gracias al desarrollo de la terapia fibrinolítica, la terapia antitrombótica y principalmente gracias al desarrollo de la angioplastia coronaria percutánea (ACP), siendo esta última la terapia de elección [Grines et al., 1993]. Sin embargo, la reperfusión del tejido isquémico, de forma paradójica, puede aumentar el daño original, una condición conocida como "daño por reperfusión miocárdica" (DRM) [Yellon, 2007].

Abundante evidencia apunta a que el DRM en el IAM se produce principalmente durante los minutos iniciales después de restaurado el flujo sanguíneo. Esto se debería a que la reperfusión estaría asociada al desencadenamiento de un fenómeno de estrés oxidativo agudo, generada principalmente por liberación masiva de especies reactivas del oxígeno (EROs), primariamente de anión superóxido [Dhalla et al., 1999, Xu et al., 2008]. Además existiría otro efecto de la revascularización, un aumento en el estrés nitrosativo, en el que el óxido nítrico desempeña un papel importante. Este radical derivado del nitrógeno es capaz de reaccionar rápidamente con el anión superóxido dando origen a otro potente oxidante, el peroxinitrito [Hrabarova et al., 2011], el cual tiene la capacidad de oxidar múltiples biomoléculas, ya sea directamente o por medio de la generación secundaria de radicales altamente reactivos. Ocasionando en consecuencia

una alteración estructural significativa en biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos [Liaudet et al., 2013].

El daño producido por la reperfusión tiene repercusiones globales a nivel cardiaco incluyendo el desarrollo de arritmias, daño microvascular, atontamiento miocárdico y muerte celular, lo que influiría directamente en el tamaño final del infarto [Rodrigo et al., 2013 A]. Incluso se ha sugerido que el DRM podría explicar hasta el 50% del tamaño final del infarto [Yellon, 2007], una parte del daño que sería potencialmente prevenible. Adicionalmente, los pacientes que sobreviven la fase aguda del IAM con una adecuada terapia de restauración del flujo, muestran una considerable morbilidad y mortalidad en el mediano a largo plazo. Esto se debe no sólo a la lesión miocárdica aguda *per se*, sino también a cambios bioquímicos, funcionales y morfológicos posteriores que ocurren en el corazón, determinando en conjunto un proceso de remodelación cardiaca [Van der Vleuten et al., 2008, St John et al., 1997].

Posterior al IAM, la remodelación abarca tanto al miocardio infartado y al no infartado [Pfeffer & Braunwald, 1990]. El proceso temprano de remodelación se debe principalmente a la expansión de la zona infartada, la cual tiene su inicio inmediatamente después de la fase aguda del IAM [Li et al., 1998]. Luego de superado el periodo agudo, con el tiempo también se producen cambios en el territorio no infartado o miocardio remoto, evidenciado por la pérdida de miocitos por apoptosis. A su vez los miocardiocitos restantes sufren de hipertrofia y elongación, además se gatillan procesos de fibrosis cicatricial e intersticial. Progresivamente, esta remodelación patológica se asocia con dilatación de las cámaras cardiacas, disminución de la función contráctil y propensión al desarrollo de arritmias [Bolognese et al., 1999].

El DRM es potencialmente traducible a resultados clínicos objetivables que van más allá del daño inmediato provocado por la reperfusión, tales como disminución de la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI). En este sentido, la utilidad de la FEVI como una medida del impacto en el IAM ha sido bien apoyado en la práctica médica. De hecho, posterior al IAM, la FEVI es un fuerte predictor de mortalidad [MPRG 1983] [Rouleau et al., 1996]. Además, la FEVI es un factor pronóstico para el

desarrollo de complicaciones no mortales después del IAM, tales como angina, reinfarto y el desarrollo de insuficiencia cardíaca [Pocock et al., 2006, Odenmuyiwa et al., 1991, Copie et al., 1996].

La hipertrofia ventricular es otra de las principales características en la que confluye la remodelación del corazón. La hipertrofia miocárdica se desarrolla en el periodo de semanas a meses en el territorio no infartado. Los responsables que han sido bien reconocidos con la capacidad de promover la hipertrofia serían; el estrés mecánico, el Eje Renina-Angiotensina-Aldosterona, catecolaminas y citoquinas. Adicionalmente, las EROs pueden ser un importante estímulo para la hipertrofia de los miocitos [Shiomi et al., 2004], la liberación crónica y sostenida de EROs se correlaciona con el desarrollo de la hipertrofia ventricular y la progresión de la insuficiencia cardíaca [Sorescu et al., 2002, Siwik et al., 2001].

El aumento de EROs y de las especies derivadas del nitrógeno, así como la falta de mecanismos antioxidantes que sean capaces de contener efectivamente este proceso son responsables de una condición global de estrés oxidativo cardiaco [W Chen et al., 2010]. Estos podrían representar un blanco farmacológico en la profilaxis del daño por reperfusión en pacientes con IAM sometidos a terapias de revascularización. Considerando el posible rol del estrés oxidativo, se han realizado diversos ensayos clínicos, basado en distintas estrategias antioxidantes con el objetivo de reducir el DRM. Sin embargo, en muchos casos los resultados fueron insatisfactorios, generando información inconsistente y contradictoria con respecto a la prevención del daño cardiovascular [Yizhou et al., 2013].

Hipótesis

“En pacientes sometidos a reperfusión por angioplastia primaria luego de un infarto agudo de miocardio con SDST, la administración endovenosa de vitamina C en conjunto a vitamina E oral durante el periodo inmediatamente posterior al infarto y luego la administración oral de ambas vitaminas hasta el día 84, podría contribuir a una mejoría en los parámetros funcionales y morfológicos, y al estado antioxidante sanguíneo.”

Objetivos:

Objetivo General:

El presente estudio está dirigido a determinar los efectos de la administración de vitaminas C y E sobre las características morfológicas y funcionales del corazón, además de los biomarcadores relacionados con estrés oxidativo, en pacientes que luego de sufrir un IAM que han sido sometidos a ACP.

Objetivos Específicos:

- 1.Determinar y comparar parámetros de la función cardíaca medida a través de RMC en el día 6 y 84 posteriores al procedimiento de reperfusión.
- 2.Determinar y comparar parámetros morfológicos cardiacos medidos a través de RMC en el día 6 y 84 posteriores al procedimiento de reperfusión
- 3.Determinar y comparar los distintos biomarcadores relacionados con estrés oxidativo durante los días de hospitalización hasta el momento del alta y su relación sobre las características morfológicas (Volumen de fin de diástole, volumen de fin de sístole y masa miocárdica) y funcionales (Fracción de eyección y volumen expulsivo) determinadas a través de la resonancia magnética cardiaca.

Metodología

El protocolo consistió en un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. Los criterios de inclusión fueron: pacientes mayores de 18 años de ambos sexos, con diagnóstico reciente de IAM con elevación del segmento ST, los cuales tenían la indicación de ACP, es decir; a) Dolor anginoso (*Angor Pectoris*) o equivalente anginoso de al menos 60 minutos de duración y b) Electrocardiograma con elevación del segmento ST de dos milímetros en al menos dos derivaciones contiguas. Se consideraron solo pacientes cuyo ingreso fue dentro de las 12 primeras horas desde el inicio de los síntomas. Además, solo los pacientes que se presentaban con su primer IAM fueron enrolados en el estudio. El reclutamiento fue efectuado en los centros cardiovasculares del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Hospital San Juan de Dios y Hospital San Borja Arriarán. Se consideraron como criterios de exclusión del estudio: antecedentes de insuficiencia hepática o renal, antecedente de insuficiencia cardíaca (New York Heart Association III,IV), shock cardiogénico, flujo coronario posterior a la ACP inferior al óptimo (Flujo TIMI <3), comorbilidad que determinara esperanza de vida menor a seis meses, embarazo y deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

La aprobación ética del estudio se obtuvo de los comités de ética institucionales y locales para cada centro hospitalario. Además se obtuvo el consentimiento informado de cada participante antes de iniciar cualquier participación en el ensayo.

Los participantes fueron asignados al azar en el momento del enrolamiento a uno de los dos grupos a través de una secuencia de aleatorización mediante el uso de software de asignación al azar online, por el método de bloques permutados aleatorios. La relación entre placebo y tratamiento fue de 1:1 para cada centro participante.

El tratamiento se inició inmediatamente después de la aleatorización. En los sujetos asignados al grupo de tratamiento antioxidante el protocolo comenzaba mediante la administración oral de una dosis única de la vitamina E como α -tocoferol (800 UI) y una infusión intravenosa de vitamina C como ascorbato de sodio (320 mM)

a una velocidad de infusión de 10 ml/min durante la hora inicial disminuyéndose a 3 ml/min durante las siguientes 2 horas. Después de realizada la ACP y concluida la infusión endovenosa, se mantuvieron dosis orales de vitamina E (400 IU / día) y vitamina C (500 mg / 12 horas) durante 3 meses continuos. En el caso de los sujetos asignados al grupo de control, la dosis oral de vitamina E fue reemplazada por cápsulas de aceite vegetal. La infusión intravenosa de vitamina C fue a su vez reemplazada por una solución salina de volumen y osmolaridad igual a la infusión de vitamina C administrada a pacientes suplementados.

Posterior al diagnóstico, los sujetos de ambos grupos fueron trasladados a la sala de hemodinamia, de acuerdo con el protocolo estándar en el IAM, se realizó una angiografía para identificar la arteria relacionada con el infarto, el porcentaje de estenosis y el flujo TIMI inicial. Luego la ACP se realizó de acuerdo con las guías clínicas actuales de cada centro cardiovascular. El acceso percutáneo se realizó en la arteria radial o femoral, de acuerdo con la decisión del médico tratante. Luego, el catéter se insertó en la arteria y se dirigió al territorio coronario, una vez identificada el área de estenosis se realizó la dilatación con el balón de angioplastia en la arteria coronaria responsable del IAM, la implantación del *stent* coronario fue decidida de acuerdo con la necesidad y al criterio del cardiólogo-hemodinamista a cargo del procedimiento.

La función y morfología cardíaca fueron evaluadas a través de resonancia magnética cardíaca (RMC), la cual se realizó al sexto día posterior al IAM y a los 84 días de seguimiento. Los datos de las RMC fueron obtenidos de forma semi-automática y evaluados a su vez por un observador independiente de forma manual, que desconoce el grupo asignado de cada paciente.

Adicionalmente se analizó el grado de perfusión miocárdica como método para evaluar la función microcirculación, a través de una graduación previamente validada "*TIMI myocardial perfusion grade*" (TMPG) [Gibson et al. 2000]). Esto fue llevado a cabo por dos observadores independientes (Cardiólogos-Hemodinamistas) que analizaron de forma posterior las grabaciones obtenidas de cada ACP.

Las determinaciones bioquímicas de los distintos biomarcadores fueron realizadas a través de muestras sanguíneas, las que se obtuvieron en cuatro distintos

momentos del seguimiento: Al momento del ingreso luego del diagnóstico de IAM, en el momento inmediatamente después de conseguida la recanalización coronaria, a las 6-8 horas después de la ACP y al momento del alta hospitalaria. Luego de la obtención de las muestras estas fueron trasladadas refrigeradas para proceder con la centrifugación de la sangre (3000 g durante 10 minutos), separándose los sobrenadantes de plasma. Luego, el sedimento de glóbulos rojos se lavó dos veces con solución salina y siendo posteriormente sometida a hemólisis con agua bidestilada. A continuación, plasma y glóbulos rojos lisados se almacenaron por separado a -80°C hasta el momento de su utilización para la medición de los distintos parámetros bioquímicos.

Se determinaron las concentraciones de vitamina C plasmática en los distintos momentos de evaluación, por medio de un método fluorimétrico [Chung 2001]. Dentro de los biomarcadores de estrés oxidativo se evaluó el glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) a través de fluorimetría [Hissin & Hilf 1976]. Además, a partir de esta medición se realizó el cálculo del índice tiólico (GSH/GSSG) con el fin de objetivar el estado *redox* intracelular en glóbulos rojos. Adicionalmente, se objetivó la capacidad antioxidante del plasma por medio de la medición de la capacidad reductora de fierro plasmática (FRAP assay) [Benzie & Strain 1996]. Conjuntamente se realizó la medición de dos marcadores de daño lipídico o lipoperoxidación; 8-isoprostanos, a través de un kit de inmunoensayo enzimático comercial (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EEUU) y Malondialdehído por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [Young et al. 1991]. Finalmente, en cada centro hospitalario se realizó la medición de un marcador de inflamación, proteína C reactiva (PCR) y un marcador de daño cardiaco, Creatina fosfoquinasa-MB (CK-MB).

Análisis estadístico.

Se realizó inicialmente la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la distribución de las variables. Los resultados se encuentran expresados como media \pm desviación estándar (DE) para las variables paramétricas y mediana más rango intercuartilico para las variables no paramétricas. Las diferencias para las variables con distribución normal se compararon mediante la prueba t-de-Student, mientras

que las variables no distribuidas normalmente fueron contrastadas mediante la prueba de Mann-Whitney-U. La comparación entre variables categóricas de los diferentes grupos se evaluó mediante la prueba de Chi-cuadrado. El coeficiente de Spearman o de Pearson se utilizó para estimar los análisis de correlación según la distribución de las variables. La diferencia entre los grupos fue considerada con significancia estadística con un valor de $p < 0,05$.

Con respecto a los resultados y cálculos de morfología cardíaca, éstos se presentaron normalizados según superficie corporal total por fórmula de Mosteller., 1987.

El tamaño muestral fue calculado según la siguiente fórmula:

$$n = 2(ZS + ZP)^2 \times S^2 / (MA - MB)^2$$

Donde "n" es el tamaño de la muestra para cada grupo, "ZS" corresponde al nivel de significancia estadística (5%), "ZP" representa la potencia (80%), "MA" es la media de grupo suplementado y "MB" la media de grupo placebo y "S" es la varianza de la determinación de CMR para la evaluación de la fracción de eyección. Considerando una pérdida de sujetos del 10%, este cálculo representó un tamaño de muestra de 36 pacientes en cada grupo.

Resultados

La población de estudio constó de 54 pacientes, 43 pacientes fueron sometidos a análisis bioquímicos completos. Por otro lado, 41 pacientes fueron sometidos a la resonancia cardiaca el día 6 y 33 pacientes completaron el seguimiento con la segunda resonancia realizada a los 84 días (Figura Anexo 1). Tres pacientes fallecieron durante la hospitalización, dos por shock cardiogénico en la sala de hemodinámia y uno por neumonía nosocomial. Ninguno de los pacientes enrolados presentó reacciones adversas atribuibles al tratamiento de suplementación antioxidante. Las características basales de los grupos, los datos angiográficos y de la ACP se presentan en la Tabla 1 y 2 respectivamente.

		Grupo Placebo (n=21)	Grupo Tratado (n=22)	p-value
Edad Promedio	años (media ±SD)	57.1 ± 7.2	59.8 ± 13.3	ns
Genero Masculino	n(%)	19 (95.2)	20 (90.9)	ns
Hipertensión	n(%)	9 (42.9)	11 (50.0)	ns
Tabaquismo	n(%)	11(52.4)	12 (54.5)	ns
Diabetes	n(%)	7 (33.3)	5 (22.7)	ns
Dislipidemia	n(%)	2 (9.5)	2 (9.0)	ns
IMC kg/m ²	(media ±SD)	30.2 ± 4.8	29.8 ± 4.2	ns
Uso de medicamentos:				
IECA o ARAII	n (%)	5 (23.8)	6(27.3)	ns
Anti-agregante plaquetario	n (%)	3(14.3)	4 (18.2)	ns
Bloqueador β-Adrenérgico	n (%)	4(19.0)	4 (18.2)	ns
Estatinas	n(%)	2(9.5)	2 (9.1)	ns
BC-Ca ⁺²	n(%)	0 (0)	1 (4.5)	ns
Diuréticos	n(%)	7 (33.3)	9 (40.9)	ns
ARA	n(%)	1 (4.7)	0(0)	ns

TABLA 1: Características basales y el uso de medicamentos de los grupos de estudio; IMC, índice de masa corporal; IECA, inhibidores del enzima convertidor la angiotensina I; ARA-II, antagonista de los receptores tipo 1 la angiotensina II; BC-Ca⁺², Bloqueador de canales de calcio; ARA, antagonista del receptor de aldosterona. Los diuréticos incluyen hidroclorotiazida y furosemida.

	Grupo Placebo (n=21)	Grupo Tratado (n=22)	p-value
Tiempo Inicio síntomas-a-Balón, min (media ± SD)	364,2 ± 172,0	331,9 ± 115,5	ns
Puerta-a-Balón, min (media ± SD)	82,9 ± 47,1	91,7 ± 32,5	ns
Coronaria Comprometida:			
CDA n (%)	13 (61,9)	13 (59,1)	ns
ACx n (%)	2 (9,5)	2 (9,1)	ns
ACD n (%)	7 (33,3)	8 (36,3)	ns
Flujo TIMI inicial	0	0	ns
Flujo TIMI post-ACP	3	3	ns
Uso de Stent n (%)	20 (95,2)	20 (90,9)	ns
Tipo de Stent			
BMS n (%)	18 (90,0)	17 (85,0)	ns
DES n (%)	2 (10,0)	3 (15,0)	ns

Tabla 2. Datos Angiográficos y del procedimiento CAD, Arteria coronaria descendente anterior; ACx, Arteria Circunfleja ; ACD, Arteria Coronaria Derecha; BMS, Stent metálico descubierto ; DES, Stent medicado liberador de droga.

Parámetros de función cardiaca:

Para analizar los cambios individuales experimentados en la FEVI de cada paciente en ambos grupos a lo largo del seguimiento, se calculó la diferencia entre la FEVI obtenida a los 84 días y a los 6 días después de la ACP (Δ FEVI% día 86 - día 6). El cambio en la FEVI obtenido por este método mostró valores significativamente más altos para el grupo tratado, con una diferencia neta en la FEVI entre ambos grupos de aproximadamente el 9% ($p < 0,05$)(Figura 1).

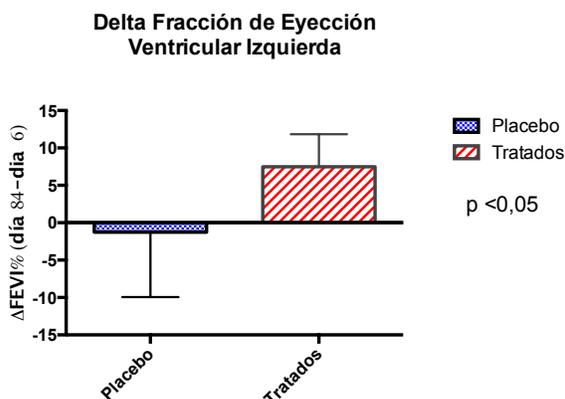


Figura 1: La figura muestra la diferencia calculada para la FEVI entre el día 84 y el día 6 posterior a la angioplastia; Δ FEVI% (día 84-día 6): Diferencia entre la fracción de eyección del ventrículo izquierdo del día 86 menos la observada el día 6.

Adicionalmente, debido a que la FEVI se estima a partir del volumen expulsivo y del volumen de fin de diástole (Fracción de eyección = Volumen expulsivo / Volumen de fin de diástole), se decidió comparar los cambios observados para el volumen expulsivo, por el mismo método anteriormente mencionado (Δ Vol. Exp. ml/m² día 84 - día 6), observándose también resultados favorables en el grupo tratado, con una diferencia entre ambos grupos de alrededor de 10 ml/m²(Figura 2).

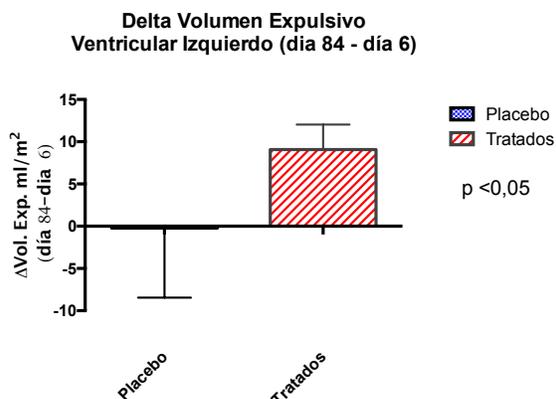


Figura 2: La figura muestra la diferencia calculada para el volumen expulsivo entre el día 84 y el día 6 posterior a la angioplastia; Δ Vol. Exp.ml/m² (día 84-día 6): Diferencia entre el volumen expulsivo del día 86 menos la observada el día 6.

En relación a la disfunción microvascular, medida por el TMPG en la angiografía, ésta mostró que después de la ACP en el grupo tratado el 95% de los pacientes logró una TMPG 2-3 y tan solo un 5% se mantuvieron con un TMPG 0-1. Por el contrario, en el grupo control solo el 79% de los pacientes mostró TMPG 2-3 y el 21% presentó un TMPG 0-1 ($p < 0,01$)(Figura 3).

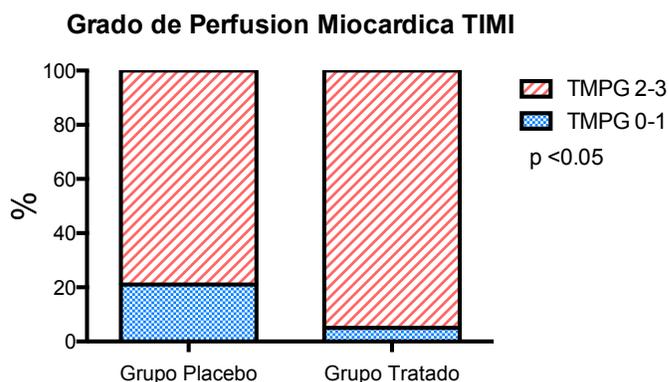


Figura 3: Disfunción microvascular medida a través del grado de perfusión miocárdica TIMI luego de la ACP. Función microvascular adecuada fue considerada con un TMPG 2-3. Se observaron diferencias significativas entre los grupos en el porcentaje de apertura adecuada del lecho microvascular.

Evaluación morfológica cardíaca:

En relación a la morfología cardíaca, todos los parámetros de volumen y masa cardíaca fueron normalizados según la superficie corporal total de los pacientes, calculado según el método de Mosteller [Mosteller., 1987]. En el relación al VFS no se observaron diferencias en la evaluación inicial ni a los 84 días de seguimiento. En relación al VFD tampoco se encontraron diferencias en la RMC basal del sexto día ni al día 84. Los datos obtenidos por la RMC para la evaluación morfológica cardíaca se resumen en la tabla 3.

	Día 6		Día 84		P-Value
	Grupo Placebo	Grupo Tratado	Grupo Placebo	Grupo Tratado	
VFS (ml/m²) media ± SD	42,8 ± 13,3	39,5 ± 15,2	44,9 ± 11,7	42,4 ± 15,1	ns
VFD (ml/ m²) media ± SD	84,2 ± 18,8	79,7 ± 20,9	87,8 ± 10,7	87,1 ± 22,7	ns
MVI (g/ m²) media ± SD	67,2 ± 7,8	68,2 ± 15,2	71,2 ± 8,3	69,3 ± 9,8	ns

Tabla 3: Parámetros morfológicos cardíacos evaluados a través de resonancia magnética cardíaca. VFS, Volumen de fin de sístole; VFD, Volumen de fin de diástole; MVI, Masa del ventrículo izquierdo.

Con respecto a la masa miocárdica, medida a través de la RMC, no se observaron diferencias significativas en el día 6 ni a los 84 días de seguimiento. Adicionalmente, se efectuó el calculo de la diferencia para la masa miocárdica entre la primera y segunda evaluación de cada paciente, a pesar de existir una diferencia de aproximadamente 5gr/m² entre ambos grupos , esta diferencia no fue significativa (Figura 4).

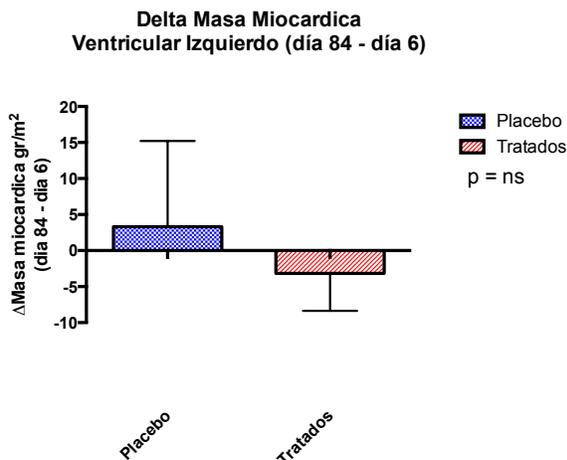


Figura 4: La figura muestra la diferencia calculada para la masa miocárdica entre el día 84 y el día 6 posterior a la angioplastia; ΔMasa miocárdica gr/m² (día 84–día 6): Diferencia entre la Masa del ventrículo izquierdo (g/m²) del día 86 menos la observada el día 6.

Parámetros bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo, marcadores de inflamación y de daño miocárdico:

En relación a los niveles de vitamina C logrados a través de la infusión endovenosa, los niveles de ascorbato medidos en plasma (mmol/L) para el grupo control fueron $0,03 \pm 0,02$ al inicio del estudio, $0,03 \pm 0,04$ inmediatamente después del inicio de la reperfusión, $0,03 \pm 0,03$ en 6 a 8 horas después del inicio de la reperfusión y $0,02 \pm 0,01$ al alta hospitalaria. A su vez, estos niveles para el grupo tratado fueron $0,10 \pm 0,20$ al inicio del estudio, $9,79 \pm 3,87$ inmediatamente después del inicio de la reperfusión, $1,79 \pm 1,51$ en las 6 a 8 horas después de la reperfusión y $0,06 \pm 0,06$ en el alta hospitalaria (Figura 5). Según esto, se encontraron las diferencias son significativas, siendo mas altos los niveles en el grupo tratado en el momento inmediatamente después de conseguida la reperfusión y a las 6 a 8 horas después de la ACP ($p < 0,01$). No se encontraron diferencias basales ni al momento del alta hospitalaria. La relevancia de evaluar los niveles de vitamina C logrados por la infusión radica en datos publicados por Jackson et al. en 1998, donde demostró que se requerían altos niveles de vitamina C plasmáticos, 10 mMol/l en este caso, para limitar la reactividad que presenta el anión superóxido con otras biomoléculas como el oxido nítrico.

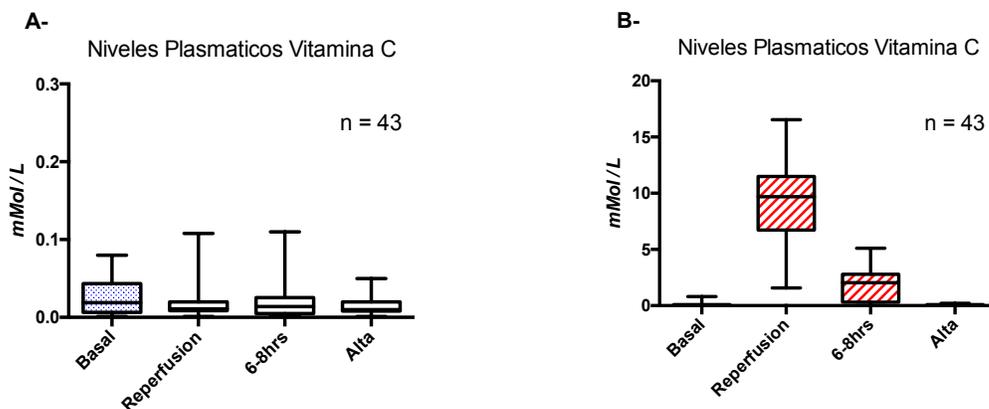


Figura 5: Concentraciones plasmáticas de vitamina C. A: Se muestra las concentraciones en los distintos momentos de evaluación para el grupo control. B: Se muestra las concentraciones en los distintos momentos de evaluación para el grupo tratado.

El potencial antioxidante, evaluado mediante el ensayo FRAP, no mostró diferencias basales entre los grupos ni al momento del alta hospitalaria. Sin embargo, se observó que los niveles de FRAP en el momento inmediatamente después de la reperfusión fueron 30 veces más altos en el grupo tratado que en el grupo control ($p < 0,01$). Además, a las 6 a 8 horas después de la reperfusión, los niveles de FRAP para el grupo tratado persistían siendo 5 veces más altos que los valores respectivos para el grupo control ($p < 0,01$) (Figura 6).

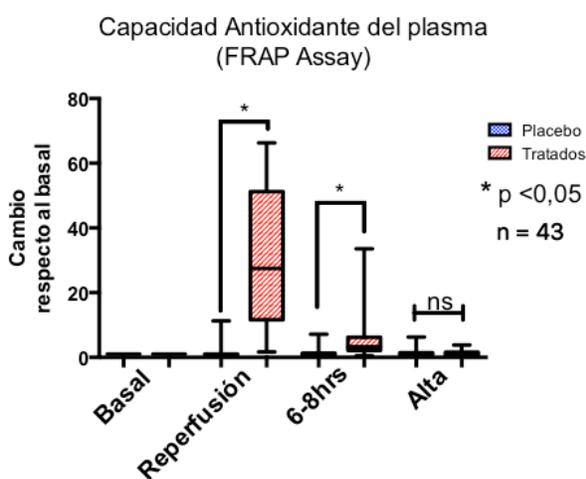


Figura 6: Capacidad antioxidante del plasma (FRAP Assay). Se muestra como cambio con respecto a los niveles basales, se observa una diferencia significativa entre los grupos en el momento de la reperfusión y a las 6 a 8 horas posteriores a la ACP. No existieron diferencias en los otros momentos de evaluación.

Adicionalmente se encontró una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de ascorbato y los niveles de FRAP en el momento inmediatamente posterior a la reperfusión (Figura 7).

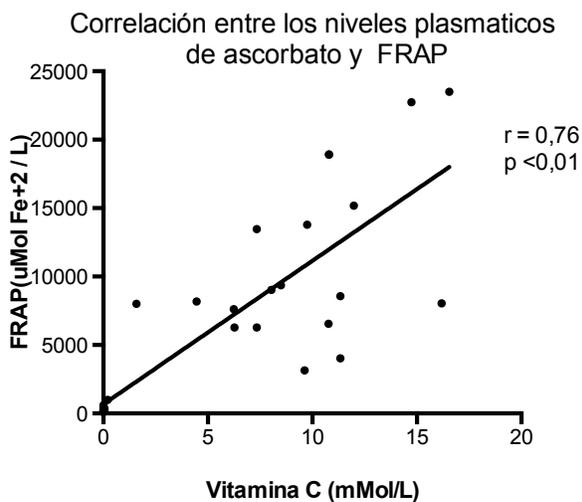


Figura 7: Correlación entre la capacidad antioxidante plasmática (FRAP) y los niveles de ascorbato obtenidos previos al momento de la reperfusión. Se observa una asociación positiva, obteniendo un índice de Spearman significativo de 0,76.

En cuanto a la relación GSH/GSSG (Índice Tiólico)(Figura 8) medida en eritrocito, ésta no mostró diferencias entre los grupos en la muestra basal, luego de la reperfusión y al momento del alta hospitalaria. Sin embargo, en el momento de 6 a 8 horas después de la ACP, donde el índice tiólico en el grupo tratado fue significativamente menor en comparación al control ($p < 0,05$).

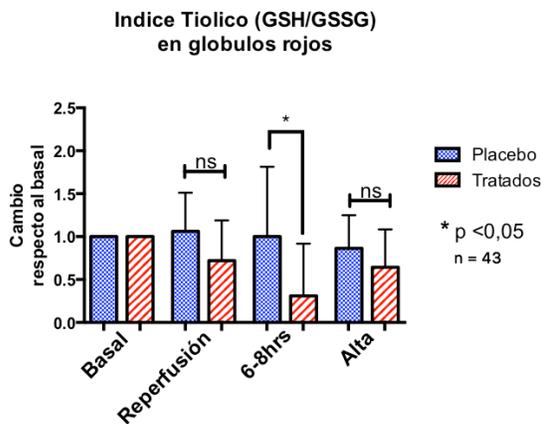


Figura 8: Índice tiólico (GSH/GSSG) eritrocitario. Se muestra como cambio con respecto a los niveles basales, se observa una diferencia significativa entre los grupos a las 6 a 8 horas posteriores a la ACP. No existieron diferencias en los otros momentos de evaluación.

Consistentemente, a las de 6 a 8 horas después de la ACP se encontró una correlación negativa entre el nivel de ascorbato en plasmático y los niveles de GSH eritrocitario. Con respecto al GSH, este presenta el mismo comportamiento. Observándose diferencias significativas solo a las 6 a 8 horas posteriores a la ACP, no hubo diferencias basales entre los grupos, luego de la reperfusión o al momento del alta hospitalaria.

En cuanto a la lipoperoxidación, la medición de 8-isoprostanos en plasma, se encontraron diferencias significativas después del inicio de la reperfusión ($p < 0,05$), elevándose 2,6 veces con respecto al basal, siendo mayor en el grupo tratado que en el control, esta diferencia entre los grupos se mantuvo también las 6 a 8 horas posteriores a la ACP (Figura 9). No se observándose diferencias en los otros momentos de evaluación.

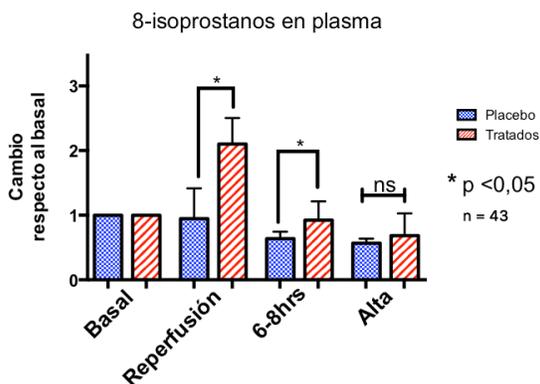


Figura 9: 8-Isoprostanos en plasma. Se muestran como cambio con respecto a los niveles basales, se observa una diferencia significativa en el momento de la reperfusión y a las 6 a 8 horas posteriores a la ACP. No existieron diferencias en los otros momentos de evaluación.

Con respecto al malondialdehído en eritrocitos, no existieron diferencias entre los grupos en ningún momento de la evaluación (Figura 10).

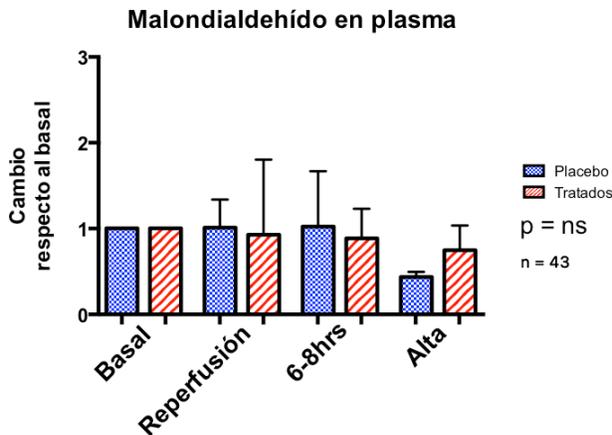


Figura 10: Malondialdehído en plasma medido por HPLC. Se muestran como cambio con respecto a los niveles basales, no se observan una diferencias significativa entre los grupos en ninguno de los momentos de evaluación posteriores a la ACP.

Debido a la falta de concordancia entre ambos marcadores de daño por estrés oxidativo, se decidió agregar un tercer biomarcador, el cual es utilizado para determinar el grado de oxidación proteica por medio de la cuantificación de grupos carbonilo en plasma. Según lo observado el comportamiento es similar al que mostró la medición de 8-isoprostanos en plasma, existiendo diferencias significativas en el momento luego de la reperfusion y en la muestra tomada a las 6-8 horas luego del procedimiento.

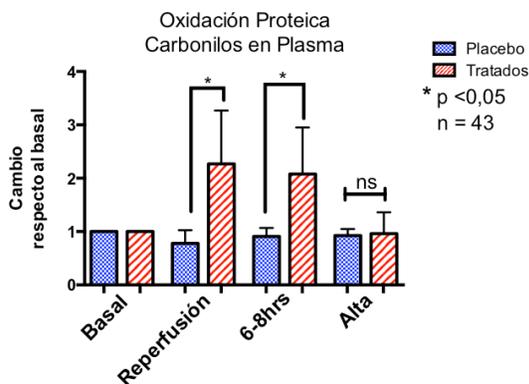


Figura 11: Carbonilos en plasma. Se muestran como cambio con respecto a los niveles basales, se observa una diferencia significativa en el momento de la reperfusion y a las 6 a 8 horas posteriores a la ACP. No existieron diferencias en los otros momentos de evaluación.

Además, para el marcador de inflamación PCR y para el biomarcador de daño miocárdico CK-MB no hubo diferencias entre los grupos en ningún momento de la evaluación.

Discusión

El presente estudio presenta una nueva estrategia contra el daño por reperfusión basado en la administración de altas dosis de ascorbato a pacientes con IAM sometidos a ACP. Los datos aquí reportados apoyan que esta terapia previene el deterioro persistente de la FEVI que generalmente se produce en estos pacientes, esto queda demostrado al analizar el cambio en la función ventricular de cada paciente, observándose una evolución positiva en el grupo tratado, hecho que no se presentó en el grupo control. Es de destacar que en la RMC realizada en el día seis, la función ventricular fue similar en ambos grupos y que las diferencias no se observaron sino hasta comparar la evolución de cada paciente luego de los tres meses posteriores al IAM. De forma similar, el cambio en el volumen expulsivo también mostró resultados favorables en el grupo tratado. La relevancia de este resultado radica en el rol pronóstico de la función cardíaca en los pacientes que sufren de un IAM. En el 2008 Van der Vleuten et al. demostraron en un estudio con 925 pacientes que una disminución del 5% en la FEVI representaba un aumento en el riesgo de mortalidad a 1 año de 1,47 veces y de 1,29 veces al plazo de 3 años. Adicionalmente, en este mismo estudio se observó que la FEVI puede ser tomada como una medición representativa de la vía común de daño miocárdico, siendo incluso mejor predictor que otras variables, como por ejemplo, biomarcadores del tamaño de infarto (peak máximo CK-MB) o la clase de *Killip*.

Según los resultados obtenidos para la morfología cardíaca, no existieron diferencias significativas en el sexto día, lo que se mantuvo sin cambios hasta los 3 meses de seguimiento. Sin embargo, es destacable la tendencia observada para la masa ventricular, donde podría interpretarse que de aumentar el tamaño muestral y el periodo de seguimiento podrían encontrarse diferencias en relación a la remodelación ventricular posterior al IAM. Sin embargo, los datos no son concluyentes para tomar esta determinación, siendo necesario ampliar el estudio en este sentido.

Otro resultado considerable, es que el tratamiento antioxidante dio lugar a una prevención de la disfunción microvascular. Generalmente, cuando se da lugar a una

disfunción microvascular severa, que limita la adecuada perfusión miocárdica, a pesar de haber sometido al paciente a una ACP exitosa se da origen a un fenómeno denominado "no-reflujo". Este es un tipo específico de daño vascular, descrito por Kloner et al. en 1974 [Kloner et al., 1974 & 1980], se produce cuando la corrección completa de la oclusión coronaria no conduce a la restauración perfusión miocárdica normal. La disfunción microvascular se ha asociado con un peor resultado clínico después del IAM [Ito et al., 1996, Wu et al., 1998], remodelación cardiaca patológica [Erlebacher et al 1984, Sutton et al 2000, Lombardo 2012] y un deterioro funcional del ventrículo [Hombach et al 2005, Choi et al. 2004, Nijveldt et al. 2008, Limalanathan et al. 2013]. Es sabido que el estrés oxidativo es uno de los principales responsables de la patogénesis de la disfunción microvascular después de la reperfusión [Garlick et al 1987, Moens et al 2005]. En este contexto, hay evidencia que sugiere que el agotamiento de los antioxidantes plasmáticos después del IAM está fuertemente asociado con la ocurrencia del fenómeno de *no-reflujo* [Matsumoto et al 2004]. Por lo tanto, es posible proponer que el tratamiento antioxidante puede haber tenido un papel beneficioso en la prevención de la disfunción microvascular. Estos resultados son consistentes con los observados en otros estudios que han sido capaces de demostrar el beneficio de la suplementación con antioxidantes en la disminución de la ocurrencia y la magnitud de la disfunción microvascular [Mc Nulty 2007, Molyneux 2002, Basili 2010].

Los resultados expuestos proporcionan evidencia de que una infusión de altas dosis de ascorbato seguido por la suplementación oral crónica con las vitaminas antioxidantes C y E es segura y puede potencialmente influir de forma positiva en el resultado clínico después del IAM. Estudios en otros contextos clínicos ya han informado de la administración segura de dosis de ascorbato incluso superiores a la utilizada en la presente investigación [Padayatti et al., 2010, Duconge et al., 2008, Stephenson et al., 2013]. Sin embargo, los mecanismos por los que la presente intervención prevendría el deterioro persistente de la función ventricular aún no se han dilucidado por completo. Dentro del análisis de estos resultados, se debe tener en cuenta que estudios previos realizados con el uso de antioxidantes orales después del IAM, no han mostrado resultados categóricos en términos de resultados clínicos

[Yizhou et al., 2013]. Sin embargo, a pesar de que las dosis orales de vitamina C y E no protegen el corazón contra peroxinitrito, efectos beneficiosos distintos de sus capacidades antioxidantes directas han sido observados cuando se administran después del IAM [De Tullio MC, 2012]. Estos efectos podrían deberse a la modulación de la producción de EROs por parte de ambas vitaminas. Una fuente importante de EROs es la actividad de la NADPH oxidasa, la cual es regulada negativamente al administrar vitamina C y E [Bhakuni P, 2006 & Ulker S, 2003]. Además, la vitamina C evitaría la oxidación de la tetrahidrobiopterina, un cofactor de la eNOS que es altamente sensible a la oxidación, evitando de este modo el desacoplamiento la eNOS con la consiguiente generación de anión superóxido [Yang Z, 2006].

Con respecto a los distintos biomarcadores medidos, el rol que desempeña el daño por isquemia-reperfusión pudo ser aminorado efectivamente por la estrategia antioxidante, la cual estaba dirigida a producir un aumento importante de la capacidad antioxidante en la sangre, capacidad que debía ser conseguida, idealmente, en el momento inmediatamente previo a obtenida la perfusión coronaria. En este sentido, los valores del FRAP en el grupo tratado fueron significativamente superiores a las del control, lo que sugiere una menor vulnerabilidad de los primeros ante una injuria oxidativa. Esta condición favorable se mantuvo en menor medida durante al menos 6 a 8 horas después del inicio de la perfusión, una fase en la que probablemente debía predominar un estado prooxidante a nivel cardiaco. Sin embargo, es interesante destacar que a pesar de esta condición protectora antioxidante se observó un aumento paradójico de los niveles plasmáticos de 8-isoprostanos y de carbonilos en plasma obtenidos después del inicio de la perfusión. Este incremento significativo en los niveles de 8-isoprostanos y carbonilos plasmáticos en el grupo que recibió el tratamiento no se encontró asociado a alteraciones funcionales ni morfológicas cardiacas. Adicionalmente, tampoco se observó un mayor grado de inflamación ni de daño miocárdico, según lo indicado respectivamente en los biomarcadores utilizados; CK-MB y PCR. En este sentido, está documentado en estudios anteriores el posible efecto prooxidante causado por altas dosis de ascorbato [Park 2008]. Donde, además de sus propiedades antioxidantes bien conocidas, dependiendo del entorno y las condiciones en el que la molécula se

encuentre, el ascorbato también podría actuar como un pro-oxidante [Halliwell, 1990]. Estudios *in vitro* han mostrado que la administración conjunta del ion Férrico (Fe^{+3}) y ascorbato inducen una potente lipoperoxidación. Cuando el Fe^{+3} está presente en el medio, la vitamina C puede convertir Fe^{+3} en Fe^{+2} , el que posteriormente es capaz de reaccionar con el oxígeno o peróxido de hidrógeno, resultando en la formación de anión superóxido y/o radicales hidroxilo [Rietjens, 2002]. Es por esto, que los presentes resultados conducirían a pensar que el efecto beneficioso de la vitamina C estaría siendo encubierto por la posible interacción entre el ascorbato y el fierro iónico liberado por la muerte celular producto de la isquemia y la movilización del fierro unido a ferritina producto de la reperfusión, con el consiguiente aumento del *pool* de fierro lábil. En resumen, es probable que la intervención realizada haya tenido dos efectos, un papel protector sobre el DRM y un efecto prooxidante menor causado por altas concentraciones de vitamina C plasmáticas y su interacción con el fierro iónico liberado de forma local. Por otro lado, también se observó una falta de concordancia entre los niveles 8-isoprostanos y malondialdehído plasmáticos, ambos biomarcadores de lipoperoxidación. Esto puede deberse a que una proporción de la generación de malondialdehído requiere la actividad de la ciclooxigenasa 1 o 2 sobre el ácido araquidónico [Esterbauer H, 1991], a diferencia de la generación de los 8-isoprostanos los cuales no dependen de las ciclooxigenasas para su formación [Morrow JD, 1990, Milne GL, 2011]. En este sentido la dosis de carga con ácido acetil salicílico que reciben los pacientes con IAM tendría la capacidad de inhibir la actividad ciclooxigenasa, lo que impediría la formación de malondialdehído, no así la de 8-isoprostanos [Sinzinger H, 1989]. Adicionalmente cabe destacar que el biomarcador más ampliamente validado con respecto al daño por estrés oxidativo corresponde a los 8-isoprostanos, los que además tuvieron el mismo comportamiento temporal que los carbonilos medidos en plasma.

Adicionalmente, llama la atención que los altos niveles de ascorbato plasmático fueron acompañados por una disminución en los niveles de GSH en los eritrocitos luego de 6 a 8 horas después del inicio de la reperfusión. Una posible explicación para este fenómeno es que la disminución de los niveles de GSH podría ser

una consecuencia del “reciclamiento” de ascorbato dependiente de glutatión, el cual tiene la capacidad de regenerar su capacidad antioxidante [Meister, 1994; Winkler et al., 1992; Winkler et al., 1994]. Sin embargo, se necesitan estudios para determinar el mecanismo real detrás del perfil antioxidante observado en los pacientes con altos niveles de ascorbato plasmático.

Finalmente, se han descrito efectos anti-inflamatorios que pueden ser inducidos por la vitamina C y E [Nakamura T 1998 & Mohamed R, 2010]. Uno de los blancos antiinflamatorios mas importantes correspondería a la inhibición de la actividad transcripcional de NF-kB, el cual es un factor nuclear de suma importancia para la expresión de genes pro-inflamatorios [Kaileh M, 2010]. Es posible que el efecto de la dosis masiva de vitamina C intravenosa se extienda más allá del primer minuto después de la reperfusión y de su actividad antioxidante directa. Teniendo en cuenta que la etiología del proceso de remodelación tiene una asociación conocida con la infiltración inmune, se podría plantear la hipótesis de que la intervención posee un papel inmunomodulador en este nivel. Como la infiltración inmune temprana juega un papel clave en la remodelación ventricular tras el IAM, se han realizado intentos para inhibir este proceso. Sin embargo, a pesar de los resultados interesantes en estudios pre-clínicos basados en intervenciones anti-inflamatorias, protocolos clínicos no han encontrado efectos beneficiosos [Seropian, 2014], probablemente debido a que estos últimos no pudieron atenuar la respuesta inmune durante las primeras horas después de la reperfusión. En este contexto, el uso de una dosis masiva de vitamina C podría atenuar la respuesta inmune asociada a al infiltrado polimorfo nuclear temprano. En apoyo de esta hipótesis, modelos animales indican que altas dosis de vitamina C intravenosa son capaces de atenuar la actividad de los neutrófilos inducida por la sepsis, efectos que también fueron apreciados en voluntarios sanos [Mohammed, 2013]. Es plausible suponer que la alta concentración de ascorbato plasmático alcanzada previa a la reperfusión podría tener un papel clave en la activación de este efecto beneficioso.

En resumen, los resultados actuales apoyan la hipótesis de que los altos niveles de ascorbato plasmático conseguidos previos a la reperfusión de pacientes con IAM

sometidos a ACP seguido de dosis orales de vitaminas C y E, tendrían un rol beneficioso sobre la función ventricular y se acompaña de mejora del flujo sanguíneo microvascular, además de observarse una tendencia a disminuir la remodelación patológica del ventrículo. Lo anterior sugiere que la limitación del estrés oxidativo estaría involucrado en los mecanismos por los que se producen estos efectos. Siendo una intervención farmacológica de bajo costo, sencilla e inocua y pudiendo ser una estrategia costo-efectiva para mejorar significativamente el pronóstico a largo plazo de los pacientes con IAM y también, eventualmente, reducir la mortalidad y la morbilidad asociada al IAM. Por otro lado, actualmente no existe ningún estudio en daño por isquemia/reperfusión cardiaca que haya utilizado dosis cercanas de vitamina c a las utilizadas en este ensayo, por lo que no es posible realizar comparaciones con otros resultados obtenidos a la fecha.

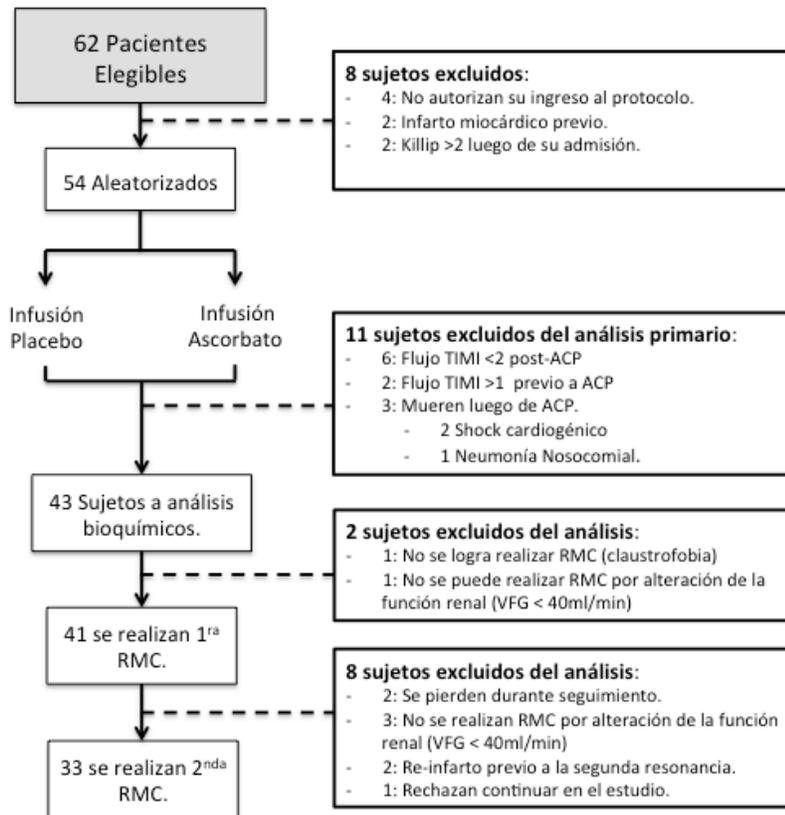


Figura Anexo 1: Diagrama de flujo con resumen de enrolamiento y causas de exclusión.

Referencias

Bhakuni P., Chandra M., Misra M. K. Effect of ascorbic acid supplementation on certain oxidative stress parameters in the post reperfusion patients of myocardial infarction. *Mol. Cell. Biochem.* 2006; **290**:153–158

Basili S, Tanzilli G, Mangieri E, Raparelli V, Di Santo S, Pignatelli P, Violi F. Intravenous ascorbic acid infusion improves myocardial perfusion grade during elective percutaneous coronary intervention: relationship with oxidative stress markers. *JACC Cardiovasc Interv.* 2010 Feb;3(2):221-9

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996 Jul;239(1):70-6.
Bolognese L, Cerisano G. Early predictors of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1999 Aug; 138(2 Pt 2): S79-83.

Braunwald E. Myocardial reperfusion, limitation of infarct size, reduction of left ventricular dysfunction, and improved survival: should the paradigm be expanded? *Circulation* 1989; 79: 441– 444.

Chen W, Frangogiannis NG. The role of inflammatory and fibrogenic pathways in heart failure associated with aging. *Heart Fail Rev.* 2010 Sep;15(5):415-22.

Choi CJ, Haji-Momenian S, Dimaria JM, Epstein FH, Bove CM. Infarct involution and improved function during healing of acute myocardial infarction: the role of microvascular obstruction. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2004;6(4): 917–925.

Chung WY, Chung JK, Szeto YT, Tomlinson B, Benzie IF. Plasma ascorbic acid: measurement, stability and clinical utility revisited. *Clin Biochem.* 2001 Nov;34(8):623-7.

Copie X, Hnatkova K, Staunton A, Fei L, Camm AJ, Malik M. Predictive power of increased heart rate versus depressed left ventricular ejection fraction and heart rate variability for risk stratification after myocardial infarction. Results of a two-year follow-up study. *J Am Coll Cardiol.* 1996 Feb;27(2):270-6.

Dhalla NS, Golfman L, Takeda S, Takeda N, Nagano M. Evidence for the role of oxidative stress in acute ischemic heart disease: a brief review. *M Can J Cardiol.* 1999 May;15:587–593.

Duconge J, Miranda-Massari JR, Gonzalez MJ, Jackson JA, Warnock W, Riordan NH. Pharmacokinetics of vitamin C: insights into the oral and intravenous administration of ascorbate. *P R Health Sci J.* 2008 Mar;27(1):7-19.

Erlebacher JA, Weiss JL, Weisfeldt ML, Bulkley BH. Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarct expansion in acute left ventricular enlargement. *J Am Coll Cardiol* 1984 Aug;4(2):201–8.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128.

Gibson CM, Cannon CP, Murphy SA, Ryan KA, Mesley R, Marble SJ, McCabe CH, Van De Werf F, Braunwald E. Relationship of TIMI myocardial perfusion grade to mortality after administration of thrombolytic drugs. *Circulation*. 2000 Jan;101(2):125-30

Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ, Slater TF. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res* 1987 Nov;61(5):757-760.

Grines CL, Browne KF, Marco J, Rothbaum D, Stone GW, O'Keefe J, Overlie P, Donohue B, Chelliah N, Timmis GC, Vlietstra R, Strzelecki M, Puchrowicz-Ochocki S, O'Neill WW. A comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; 328: 673-679.

Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*. 1990;9(1):1-32.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976 Jul;74(1):214-26

Hrabarova E, Juranek I, Soltes L. Pro-oxidative effect of peroxynitrite regarding biological systems: a special focus on high-molar-mass hyaluronan degradation. *Gen Physiol Biophys*. 2011 Sep;30(3):223-38

Hombach V, Grebe O, Merkle N, Waldenmaier S, Hoher M. Sequelae of acute myocardial infarction regarding cardiac structure and function and their prognostic significance as assessed by magnetic resonance imaging. *Eur Heart J*. 2005 Mar;26(6):549-57

Ito H, Maruyama A, Iwakura K, Takiuchi S, Masuyama T, Hori M, Higashino Y, Fujii K, Minamino T. Clinical implications of the 'no-reflow' phenomenon: a predictor of complications and left ventricular remodeling in reperfused anterior wall myocardial infarction. *Circulation*. 1996 Jan;93(2):223-228.

T.S. Jackson, A Xu, J.A. Vita, J.F. Keaney. Ascorbate Prevents the Interaction of Superoxide and Nitric Oxide Only at Very High Physiological Concentrations. *Circ Res*. 1998;83:916-922

Kaileh M, Sen R. Role of NF- κ B in the anti-inflammatory effects of tocotrienols. *J. Am. Coll. Nutr*. 2010;29(Suppl. 3):334S-339S

Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*. 1974 Dec;54(6):1496-508.

Kloner RA, Rude RE, Carlson N, Maroko PR, DeBoer LWV, Braunwald E. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation*. 1980 Nov;62(5):945-952.

Li WG, Zaheer A, Coppey L, Oskarsson HJ. Activation of JNK in the remote myocardium after large myocardial infarction in rats. *Biochem. Biophys Res Commun*. 1998 May;246(3):816-820.

Liaudet L, Rosenblatt-Velin N, Pacher P. Role of peroxynitrite in the cardiovascular dysfunction of septic shock. *Curr Vasc Pharmacol*. 2013 Mar;11(2):196-207.

Limalanathan S, Eritsland J, Andersen GØ, Kløw NE, Abdelnoor M, & Hoffmann P. Myocardial salvage is reduced in primary PCI-treated STEMI patients with microvascular obstruction, demonstrated by early and late CMR. *PloS One*. 2013 Aug; 8(8), e71780.

Lombardo A, Niccoli G, Natale L, Bernardini A, Cosentino N, Bonomo L, & Crea F. Impact of microvascular obstruction and infarct size on left ventricular remodeling in reperfused myocardial infarction: a contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging study. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2012;28(4):835-42.

Matsumoto H, Inoue N, Takaoka H, Hata K, Shinke T, Yoshikawa R, Masai H, Watanabe S, Ozawa T, Yokoyama M. Depletion of antioxidants is associated with no-reflow phenomenon in acute myocardial infarction. *Clin Cardiol*. 2004 Aug;27(8):466-70.

McNulty PH, Robertson BJ, Tulli MA, Hess J, Harach LA, Scott S, Sinoway LI. Effect of hyperoxia and vitamin C on coronary blood flow in patients with ischemic heart disease. *J Appl Physiol* (1985). 2007 May;102(5):2040-5

Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem*. 1994 Apr;269(13):9397-400.

Milne GL, Yin H, Hardy KD, Davies SS, Roberts LJ. Isoprostane generation and function. *Chem Rev*. 2011 Oct 12;111(10):5973-96.

Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol*. 2005 Apr 20;100(2):179-90.

Milne GL, Yin H, Hardy KD, Davies SS, Roberts LJ. Isoprostane generation and function. *Chem Rev*. 2011 Oct 12;111(10):5973-96.

Mohamed R, Dharmappa KK, Tarannum S, Jameel NM, Kannum SA, Ashrafulla HS, Rai L, Souza CJ, Shekhar MA, Vishwanath BS. Chemical modification of ascorbic acid and evaluation of its lipophilic derivatives as inhibitors of secretory phospholipase A2 with anti-inflammatory activity. *Mol. Cell. Biochem*. 2010;345:69-76.

Mohammed BM, Fisher BJ, Kraskauskas D, Farkas D, Brophy DF, Fowler AA 3rd, Natarajan R. Vitamin C: a novel regulator of neutrophil extracellular trap formation. *Nutrients*. 2013 Aug 9;5(8):3131-51.

Molyneux CA, Glyn MC, Ward BJ. Oxidative Stress and Cardiac Microvascular Structure in Ischemia and Reperfusion: The Protective Effect of Antioxidant Vitamins. *Microvasc Res*. 2002 Sep;64(2):265-77.

Morrow JD, Harris TM, Roberts LJ. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem*. 1990 Jan;184(1):1-10.

Nakamura T, Goto M, Matsumoto A, Tanaka I. Inhibition of NF- κ B transcriptional activity by α -tocopheryl succinate. *Biofactors*. 1998;7:21–30

Nijveldt R, Beek AM, Hirsch A, Stoel MG, Hofman MB, Umans VA, Algra PR, Twisk JW, van Rossum AC. Functional recovery after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2008 Jul 15;52(3):181-9

Odemuyiwa O, Malik M, Farrell T, Bashir Y, Poloniecki J, Camm J. Comparison of the predictive characteristics of heart rate variability index and left ventricular ejection fraction for all-cause mortality, arrhythmic events and sudden death after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1991 Aug ;68(5):434-9.

Padayatty SJ, Sun AY, Chen Q, Espey MG, Drisko J, Levine M. Vitamin C: intravenous use by complementary and alternative medicine practitioners and adverse effects. *PloS One*. 2010 Jul 7;5(7):e11414.

Park SW, Lee SM. Antioxidant and prooxidant properties of ascorbic acid on hepatic dysfunction induced by cold ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2008;580:401–6.

Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990 Apr;81:1161-72.

Pocock SJ, Wang D, Pfeffer MA, Yusuf S, McMurray JJ, Swedberg KB, Ostergren J, Michelson EL, Pieper KS, Granger CB. Predictors of mortality and morbidity in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2006;27:65–75.

Rietjens IMCM, Boersma MG, Haan L De, Spenkeliink B, Awad HM, Cnubben NHP, et al. The prooxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2002;11(3):321–33.

Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Molecular basis of cardioprotective effect of antioxidant vitamins in myocardial infarction. *Biomed Res Int*. 2013 Jul;2013:437613.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, et al. ; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2011; 123: 18-209.

Rouleau JL, Talajic M, Sussex B, Potvin L, Warnica W, Davies RF, Gardner M, Stewart D, Plante S, Dupuis R, Lauzon C, Ferguson J, Mikes E, Balnozan V, Savard P. Myocardial infarction patients in the 1990s-their risk factors, stratification and survival in Canada: the Canadian Assessment of Myocardial Infarction (CAMI) Study. *J Am Coll Cardiol*. 1996 Apr;27(5):1119-27.

Seropian IM, Toldo S, Van Tassell BW, Abbate A. Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Apr 29;63(16):1593-603.

Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2004;109:544-9.

Sinzinger H, Virgolini I, Peskar BA. Response of thromboxane B₂, malondialdehyde and platelet sensitivity to 3 weeks low-dose aspirin (ASA) in healthy volunteers. *Thromb Res.* 1989 Feb 1;53(3):261-9.

Siwik DA, Tzortzis JD, Pimental DR, et al. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ Res.* 1999;85:147-53.

St John SM, Pfeffer MA, Moya L, et al. Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction: baseline predictors and impact of longterm use of captopril: information from the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) trial. *Circulation* 1997 Nov; 96: 3294-99

Stephenson CM, Levin RD, Spector T, Lis CG. Phase I clinical trial to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of high-dose intravenous ascorbic acid in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013 Jul;72(1):139-46.

Sorescu D, Griendling KK. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congest Heart Fail* 2002;8:132-40.

Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000 Jun;101(25): 2981-8

The Multicenter Postinfarction Research Group. Risk stratification and survival after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1983 Aug;309(6):331-6.

Ulker S, McKeown PP, Bayraktutan U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension* 2003;41:534-539

Van der Vleuten PA, Rasoul S, Huurnink W, et al. The importance of left ventricular function for longterm outcome after primary percutaneous coronary intervention. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2008 Feb; 8:4.

Winkler BS. Unequivocal evidence in support of the nonenzymatic redox coupling between glutathione/glutathione disulfide and ascorbic acid/dehydroascorbic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Oct;1117:287-290.

Winkler BS, Orselli SM, Rex TS. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. *Free Radic Biol Med.* 1994 Oct;17:333-349.

World Health Organization (WHO) [Internet]. Methods and data sources for global causes of death 2000-2012. Global Health Estimates Technical Paper WHO/HIS/HSI/GHE/2014.7. 2014 Jun

Wu KC, Zerhouni EA, Judd RM, Lugo-Oliveri CH, Barouch LA. Prognostic significance of microvascular obstruction by magnetic resonance imaging in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 1998 Mar 3;97(8):765-72.

Xu Y, Liu B, Zweier JL, He G. Formation of hydrogen peroxide and reduction of peroxynitrite via dismutation of superoxide at reperfusion enhances myocardial blood flow and oxygen consumption in postischemic mouse heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Nov;327(2):402-10

Yang Z., Ming X. F. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin. Med. Res*. 2006;4:53-65

Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007 Sep 13;357(11):1121-35.

Yizhou Ye, Jing Li, and Zhongxiang Yuan. Effect of Antioxidant Vitamin Supplementation on Cardiovascular Outcomes: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One*. 2013 Feb; 8(2): e56803.

Young IS, Trimble ER. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann Clin Biochem*. 1991; 28: 504-8.