Nueva estrategia de preconditionamiento no hipóxico que atenúa el efecto de la Isquemia-Reperusión en pacientes sometidos a cirugía cardíaca con circulación extracorpórea

Rodrigo Castillo¹, Ramón Rodrigo¹, Rodrigo Pizarro¹, Matías Escobar¹, Mauricio Cereceda², René Asenjo², Ernesto Larraín², Rodrigo Castillo-Koch², Juan Espinoza², Gina Sánchez³, Paulina Donoso³, Julia Araya⁴.

¹ Laboratorio de Fisiopatología Renal, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

² Centro Cardiovascular, Hospital Clínico, Universidad de Chile

³ Laboratorio de Señales mediadas por Calcio, Centro FONDAP, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

⁴ Departamento de Nutrición Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Resumen

Antecedentes de la investigación: El preconditionamiento hipóxico se ha utilizado como medida de protección para el miocardio, sin embargo es clínicamente inaplicable. Las especies reactivas de oxígeno (ERO), estarían involucradas en la producción de modificaciones estructurales y eléctricas, que hacen susceptible al tejido auricular a arritmias y disfunción contráctil. Por lo tanto, un reforzamiento del sistema de defensa antioxidante protegería al corazón del daño hipóxico.

Objetivo: Determinar el efecto de la suplementación de Omega 3 y vitaminas antioxidantes C y E, en el estado antioxidante de pacientes sometidos a cirugía cardíaca con circulación extracorpórea (CEC).

Métodos: Un total de 50 pacientes se incluyó en el protocolo. Se randomizaron 15 pacientes a recibir Omega 3, siete días antes de la cirugía, y vitaminas C y E, dos días antes de la cirugía, ambos hasta el post-operatorio y 15 a placebo. Los valores controles se obtuvieron en 20 pacientes sin intervención farmacológica preconditionante. Se obtuvieron muestras de sangre en condiciones basales, antes del inicio de las vitaminas, 6-8 h post-operatorio y al alta para la determinación del estado antioxidante (capacidad antioxidante del plasma, FRAP; relación glutatión reducido (GSH)/oxidado (GSSG) y enzimas antioxidantes en eritrocito y daño oxidativo (malondialdehído y F2 - isoprostanos en plasma). En tejido se midió por Western Blot la expresión de la subunidad catalítica de la NADPH oxidasa (NOX-2) y la citosólica p47^{phox}. La localización de la subunidad de membrana NOX-2/gp91^{phox} se evidenció mediante inmunofluorescencia. Como índice de daño oxidativo en tejido se utilizaron los niveles de malondialdehído. Se utilizó análisis multivariado ANOVA con post-test de una vía de Bonferroni.

Resultados: Al momento de la cirugía, los pacientes que habían recibido tratamiento, presentaban niveles de GSH/GSSG un 56% mayor ($p < 0.03$); en el post-operatorio inmediato tenían valores mayores de FRAP (30%; $p < 0.04$) y glutatión peroxidasa (25%; $p < 0.05$) que el grupo placebo. En el tejido auricular había menor expresión de la subunidad NOX-2/ gp91^{phox} y de la subunidad citosólica p47^{phox} en los tratados. La presencia de gp91^{phox} en la membrana plasmática de los cardiomiocitos se confirmó por inmunofluorescencia. En cuanto al daño oxidativo en plasma y tejido, los niveles de malondialdehído fueron 21 ($p < 0.03$) y 46 % ($p < 0.05$) menores y los niveles plasmáticos de F2-isoprostano 27% ($p < 0.04$) menores en el grupo que recibió tratamiento.

Correspondencia: Dr. Rodrigo Castillo Peñaloza
Laboratorio de Fisiopatología Renal
Programa de Farmacología Molecular y Clínica
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Independencia 1027, Casilla 70058, Santiago 7, Chile
Teléfono: 56-2-9786126 Fax: 56-2-9786943
Correo Electrónico: rodrigouch@gmail.com

Conclusiones: La suplementación con Omega 3 y vitaminas antioxidantes, atenúa el daño oxidativo en pacientes sometidos a cirugía cardíaca con CEC. Se sugiere que este efecto podría obedecer al menos en parte a una regulación negativa de la actividad de la NADPH oxidasa de los cardiomiocitos.

Palabras claves: Cirugía cardíaca, estrés oxidativo, tejido auricular, NADPH oxidasa.

A new strategy of non hypoxic pre conditioning attenuating ischemia-reperfusion injury in patients submitted to cardiac surgery with extracorporeal circulation

Background: Oxygen reactive species (ORS) might be involved in structural and electrical changes rendering the atria susceptible to arrhythmias and contractile dysfunction.

Aim: to determine the effect of supplementation with omega-3 and vitamins C and E on the anti-oxidative capacity of patients submitted to cardiac surgery with extracorporeal circulation (EC).

Methods: the study was performed on 50 patients: 15 received omega-3 7 days before and vitamins C and E 2 days before surgery; 15 patients received placebo; 30 patients served as controls and did not received drugs or placebo. Blood samples were obtained before omega-3 administration, again before vitamin administration, 6-8 hr postoperatively and at discharge. Plasma antioxidant capacity (FRAP), the relation of reduced to oxidized glutathione (GSH/GSSG), erythrocyte antioxidant enzymes and oxidative stress (malon-dialdehyde (MDA) and F2 isoprostanes) were measured. Western blott was used to determine the expression of the catalytic subunit of NADPH oxydase (NOX-2) and its cytosolic fraction (p47phox). Immunofluorescence was used to localize the membrane subunit NOX-2/gp91phox. The levels of MDA were used as an index of oxidative stress. Statistical analysis was performed with ANOVA and one-way post test Bonferroni.

Results: treated patients had 56% greater levels of GSH/GSSG at the time of surgery; after the operation their FRAP values were 30% greater and glutathione peroxydase 25% greater than the placebo group. Treated patients also had a decreased expression of NOX-2/gp91phox and p47phox compared to placebo. The presence of gp91phox in the plasma membrane of cardiomyocytes was confirmed by immunofluorescence. Plasma MDA levels were 21% lower and tissue levels 46% lower in the treated group. Also, F2-isoprostanes were 27% lower in the same group.

Conclusion: omega-3 and antioxidant vitamin supplementation decreases the oxidative stress in patients undergoing cardiac surgery with EC. It is postulated that the observed effect might be related to down-regulation of NADPH oxydase in cardiomyocytes.

Key words: Cardiac surgery, oxidative stress, atrial tissue, NADPH oxidase.

Recibido el 26 de diciembre de 2008. Aceptado el 9 de enero de 2009

Rev Chil Cardiol 2009; 28: 31-44

Introducción

Recientes estudios dan cuenta del importante papel de las especies reactivas del oxígeno (ERO) en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares. Además, en condiciones fisiológicas normales, las ERO pueden intervenir en la regulación de procesos fisiológicos como el crecimiento celular e inmunidad,

actuando como segundos mensajeros¹. En los pacientes sometidos a cirugía cardíaca con circulación extracorpórea (CEC) el tejido es sometido inevitablemente a un ciclo de isquemia-reperfusión (IR) que incrementa la tasa de generación de ERO, las cuales producen modificaciones bioquímicas de biomoléculas, resultando en alteraciones estructurales y eléctricas. Estos cambios alteran las propiedades del tejido

auricular que son necesarias para el cumplimiento de funciones tan importantes como la contractilidad y la conducción del impulso eléctrico. En consecuencia, se pueden desarrollar trastornos cardíacos que incluyen principalmente a las arritmias e insuficiencia cardíaca. Actualmente existe evidencia de la asociación entre el daño oxidativo en el tejido cardíaco posterior a la cirugía con CEC y la actividad de ciertos sistemas enzimáticos productores de ERO, como xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa, etc². La NADPH oxidasa es la mayor fuente de superóxido (O₂·-) en las células endoteliales y en los cardiomiocitos³. La actividad de esta enzima ha demostrado la asociación de su actividad con el daño oxidativo en órganos blancos, como el riñón en el caso de la diabetes mellitus⁴, la hipertensión arterial⁵ y el infarto agudo de miocardio⁶. Últimamente, se ha relacionado su abundancia y actividad como principal marcador predictor de fibrilación auricular postoperatoria (FAPO), importante evento de morbilidad en este grupo de pacientes, independiente de su etiología quirúrgica⁷.

Con el propósito de disminuir la vulnerabilidad del tejido miocárdico a la ocurrencia de estas alteraciones estructurales y funcionales provocadas por el ciclo IR, se ha recurrido a modelos de preconditionamiento, consistentes en medidas aplicables con antelación al evento quirúrgico. El modelo de preconditionamiento hipóxico, por ejemplo, plantea que eventos repetidos de isquemia de corta duración en el tejido cardíaco, despiertan respuestas celulares protectoras frente a un evento isquémico mayor⁸. Esta estrategia es de aplicación muy limitada desde el punto de vista clínico en este tipo de pacientes. Sin embargo, existen estrategias más factibles de ser utilizadas en estos casos y que consisten en lograr un efecto similar a través de recursos farmacológicos sin someter al paciente a un riesgo de complicación evidente⁹. Muy recientemente, se ha acuñado el término de preconditionamiento no hipóxico. Un ejemplo de este último es la utilización de los ácidos grasos omega-3 en la prevención de las arritmias postoperatorias, las cuales se asocian a mayor morbilidad postquirúrgica, aumento del costo y de los días de hospitalización¹⁰. Estos compuestos están siendo utilizados en forma creciente

debido a sus propiedades antiinflamatorias¹¹, antiarrítmicas¹² y anticoagulantes¹³, demostradas en estudios in vitro^{14, 15}, in vivo^{16, 17}, y en grandes estudios clínicos en pacientes con cardiopatía coronaria que reducen su mortalidad por eventos cardiovasculares posterior a un infarto (18, 19).

De especial relevancia ha resultado el estudio realizado por Calò y cols, 2005¹², quienes demostraron que la administración previa de Omega 3 (2 g al día durante 5 días) a pacientes que van a ser sometidos a cirugía cardíaca, disminuye la incidencia de FAPO en un 50%.

Además, se ha demostrado que los antioxidantes como la vitamina C administrados a este mismo tipo de pacientes, como así mismo a animales de experimentación, también contribuye a disminuir la ocurrencia de arritmias postoperatorias²⁰. Sin embargo, el mecanismo por el cual este efecto se produce es distinto al que logró el modelo utilizado por Calò, siendo ambos aplicables a un mismo paciente con lo cual se espera la optimización del efecto preconditionante.

Sobre la base de los antecedentes analizados, nosotros planteamos el diseño de un nuevo protocolo, basado en un modelo de preconditionamiento no hipóxico que utiliza tanto la acción de los ácidos grasos Omega-3 como el efecto antioxidante de las vitaminas C y E con el objetivo de preparar al miocardio para la injuria por IR postquirúrgica a la que inevitablemente se verá sometido.

Objetivo.

Determinar el efecto de la suplementación con Omega 3 y vitaminas antioxidantes C y E sobre el estado antioxidante en tejido auricular y sangre de pacientes sometidos a cirugía cardíaca con circulación extracorpórea.

Métodos

1 Tipo estudio

Se trata de un ensayo clínico controlado, randomizado, doble ciego, que ha incluido 50 pacientes (20 controles y 30 suplementados)

sometidos a cirugía cardíaca con circulación extracorpórea entre julio de 2007 y septiembre de 2008, en el Centro Cardiovascular del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico, el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y del Servicio de Salud Metropolitano Norte.

El consentimiento informado fue firmado los pacientes antes de ingresar al protocolo. En la Tablas 1, 2 y 3 se describen las principales características demográficas de la población en estudio, el uso de fármacos y las variables quirúrgicas de los grupos placebo y suplemento.

Las cápsulas de Omega 3 y las vitaminas C y E para el tratamiento fueron proporcionadas por el Laboratorio PROCAPS® y analizadas por cromatografía de gases para determinar su exacta composición de ácidos grasos. Este análisis dio como resultado una proporción de 1:2 de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), respectivamente, equivalente a la proporción comunicada en el estudio de Calò (2005). Se administró 2 g de suplemento de Omega 3 desde 5 días antes de la cirugía, al cual

se agregó 500 mg cada 12 horas de ácido ascórbico y 400 UI de vitamina E cada 24 horas desde 2 días antes de la cirugía y ambos suplementos se continuaron administrando hasta el alta, o los respectivos placebos.

Los criterios de inclusión para ingresar al protocolo son:

- 1.- Mayor de 18 años y menor de 80 años
- 2.- Cirugía cardíaca no congénita
- 3.- Ritmo sinusal al momento de la randomización

Los criterios de exclusión del ingreso al protocolo son:

- 1.- FA crónica.
- 2.- Reoperación cardíaca.
- 3.- Ingesta de vitamina C o E, un mes previo al estudio.
- 4.- Insuficiencia renal crónica (creatinemia > 2.0 mg/dl).
- 5.- Insuficiencia hepática (bilirrubinemia > 3.0 mg/dl o albuminemia < 3.5g/dl o protrombinemia < 60% en ausencia de terapia anticoagulante oral, signos ecográficos de daño hepático crónico o presencia de várices esofágicas.
- 6.- Embarazo.
- 7.- Cardiopatía congénita.
- 8.- Cirugía de urgencia.

Tabla 1. Distribución demográfica de la muestra más comorbilidades

Variable	Placebo (n=15)	Suplemento (n=15)	P
Edad ± SEM	56.5±5.28	57±11.5	ns
IMC ± SEM	27.15±4.7	26.1±3.9	ns
Historia de hipertensión, n (%)	11(70)	12 (80)	ns
Diabetes mellitus, n (%)	5(33.3)	6 (40)	ns
Historia de dislipidemia, n (%)	5(33.3)	7 (46.6)	ns
Historia de tabaquismo, n (%)	6(40)	8 (53.3)	ns

ns diferencias no significativas p>0.05

Tabla 2. Uso de fármacos en pacientes sometidos a estudio

Variable	Placebo (n=15)	Suplemento (n=15)	P
ASA, n (%)	12(80)	8 (53.3)	ns
Atorvastatina, n (%)	9 (60)	7 (46.6)	ns
Otra estatina, n (%)	1 (6.6)	0	ns
IECA, n (%)	12 (80)	12 (80)	ns
ARAI	1 (6.6)	0	ns
Espironolactona, n (%)	1 (6.6)	0	ns
Betabloquadores, n (%)	10 (66.6)	11 (73.3)	ns

ns diferencias no significativas p>0.05

Tabla 3. Distribución de la muestra según su patología quirúrgica y tiempos en bomba (CEC)

Variable	Placebo (n=15)	Suplemento (n=15)	P
Coronarios, n (%)	9 (60)	8 (53.3)	ns
Valvulopatías, n (%)	4 (26.6)	6 (40)	ns
Mixtos, n (%)	2 (13.3)	1 (6.6)	ns
Tiempo de Clamp, min	75,3	73,4	ns
Tiempo en CEC, min	82,9	108	ns
Tiempo de reperusión, min	14	29,4	ns

ns diferencias no significativas $p > 0.05$

2 Procedimientos analíticos

2.1 Estandarización de técnicas

Cabe destacar que este grupo comprende 20 pacientes con ritmo sinusal, sin enfermedades causantes de estrés oxidativo o inflamación (diabetes, hipertensión, etc). Esto con el fin de determinar los valores normales de los distintos parámetros.

Se obtuvieron 5 muestras de sangre para el análisis en plasma y eritrocito de distintos biomarcadores de estrés oxidativo: la primera al momento del ingreso al protocolo, la segunda antes del inicio de las vitaminas antioxidantes (día-2), la tercera antes de entrar en circulación extracorpórea, la cuarta en el postoperatorio inmediato (6-12 horas) y la quinta al alta. La muestra de tejido se obtuvo en el momento de canular la orejuela derecha que fue separada en 2 partes iguales, una llevada a solución de cardioplejia y otra a nitrógeno líquido.

2.2 Determinación del estado antioxidante

a) Capacidad antioxidante total del plasma FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)²¹. Determina la habilidad de las sustancias antioxidantes del plasma de reducir el ión férrico Fe-III a ión ferroso (Fe²⁺), cuyo producto absorbe a 596 nm. El límite de detección es de 10 $\mu\text{mol/L}$. El valor promedio de FRAP para la población normal (N=20) fue de 290 ± 28 . (Ver Tabla 4).

b) Determinación de la concentración plasmática de vitamina C por fluorimetría²² y E por HPLC²³. La vitamina C fue medida por el método FRASC (ferric reducing/antioxidant and ascorbic acid)

con un límite de detección de 3.0 $\mu\text{mol/L}$ y valores promedio de $41.3 \pm 1.9 \mu\text{mol/L}$. En el caso de los niveles de tocoferol fueron determinados por la técnica de Cromatografía Líquida de alta precisión (HPLC) con detección fluométrica. (Ver Tabla 4).

c) Relación glutatión reducido (GSH)/glutatión oxidado (GSSG) en eritrocitos por fluorimetría²⁴ a 350 nm como parámetro del estado redox intracelular. Los valores promedio de esta relación en eritrocito y tejido auricular para sujetos sanos fueron de 5.81 ± 0.19 y 6.65 ± 0.77 , respectivamente, valores acorde con lo reportado en la literatura²⁵.

d) Actividad de las enzimas antioxidantes en eritrocito. La actividad de catalasa (CAT) fue determinada por el método descrito por Aebi y cols²⁶, basada en la cinética de descomposición del peróxido de hidrógeno a 240 nm, y expresada en base a la constante de primer orden (k)/mg proteína o g hemoglobina, respectivamente. La actividad de superóxido dismutasa (SOD) está basada en la disminución de la autooxidación de catecoles a 480 nm. Una unidad de SOD se definió como la actividad que dobla la autooxidación²⁷. La actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px) se midió en fracción citosólica (sobrenadante de 100.000 g) por un método espectrofotométrico basado en la reducción del glutatión disulfuro acoplado a la oxidación de NADPH por la glutatión reductasa²⁸. Una unidad de GSH-Px se definió como la actividad que oxida 1 μmol de NADPH por minuto. Los valores en sujetos controles en eritrocito y tejido auricular se muestran en la Tabla 4.

2.3 Parámetros de estrés oxidativo

Lipoperoxidación: Se determinaron los niveles plasmáticos de F2 isoprostanos mediante inmunoensayo enzimático (EIA), usando Kits (Cayman, Chemical, Ann Arbor, MI)²⁹ como reflejo de la lipoperoxidación in vivo al momento de la cirugía.

La lipoperoxidación en plasma y tejido se determinó

también al momento de la cirugía. Se midió a través de la detección fluorimétrica del aducto malondialdehído-ácido tiobarbitúrico mediante la técnica de HPLC con extracción sin solvente orgánico, utilizando como estándar 1,1,3,3 - tetrametoxipropano³⁰. Los valores promedio de malondialdehído en plasma y tejido de sujetos sanos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros de estrés oxidativo en plasma, eritrocito y orejuela derecha de pacientes controles, placebos y suplementados, obtenida en la cirugía, antes de entrar en con CEC

	Control n=20	Placebo n=15	Suplementado n=15
<i>PLASMA</i>			
FRAP (µmoles/L)	290 ± 28	307 ± 17	421 ± 19 ^a
F2 isoprostanos (pmoles/L)	67.8 ± 4.0	72.3 ± 3.2	56.9 ± 2.1 ^a
Malondialdehído (MDA) (µmoles/L):	0.80 ± 0.05	0.81 ± 0.022	0.66 ± 0.015 ^a
Vitamina C (µmoles/L)	41.3 ± 1.9	39.2 ± 2.3	47.7 ± 1.9 ^a
Vitamina E (µmoles/L)	15.6 ± 1.3	16.6 ± 1.5	21.2 ± 1.7 ^a
<i>ERITROCITO</i>			
Relación GSH/GSSG*	5.81 ± 0.19	6.08 ± 0.17	9.2 ± 1.1 ^a
Catalasa (k/mg proteína)**	283.5 ± 7.3	252.6 ± 9.8	303.4 ± 9.7
Glutación peroxidasa (U/mg proteína)	5.84 ± 0.20	5.47 ± 0.3	6.09 ± 0.5
Superóxido dismutasa (U/mg proteína)	948 ± 27	1086 ± 22	1102 ± 21
<i>TEJIDO AURICULAR</i>			
Malondialdehído (µmoles/mg proteína)	3.99 ± 0.93	4.11 ± 0.81	2.88 ± 0.82 ^a
Relación GSH/GSSG*	6.65 ± 0.77	7.8 ± 0.99	10.2 ± 1.1 ^a
Catalasa (k/mg proteína)**	0.77 ± 0.06	0.71 ± 0.02	1.11 ± 0.07 ^a
Glutación peroxidasa (U/mg proteína)	0.51 ± 0.04	0.47 ± 0.02	0.69 ± 0.03 ^a
Superóxido dismutasa (U/mg proteína)	10.99 ± 0.91	11.36 ± 0.85	11.02 ± 0.21

Los valores para cada determinación se expresan para cada grupo en promedio ± EE para 15 muestras por grupo randomizado a placebo y 15 a suplemento. ^a Diferencia significativa v/s grupo placebo. p < 0.05

*GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado. ** k, constante cinética de primer orden para la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno.

2.4 Análisis en tejido auricular

a) Inmunofluorescencia: Determinación de la subunidad catalítica Nox-2 de la NADPH oxidasa³¹. Se cortaron muestras de 5-10 µm, fijadas en paraformaldehído, y bloqueadas con mezcla de PBS/BSA/tritón al 0,2%. Se probaron anticuerpos

primarios anti-rabbit (Sta. Cruz) 1/300, antimouse 1/100 (Sta. Cruz). Se utilizó para la obtención, y posterior análisis, la intensidad de los canales verde y rojo por el microscopio confocal (LSM 5-Pascal, Axiovert 200, Zeiss): intensity I [0, 255], x63 oil, NA 1.4, la excitación/emisión fue 488/505-530 nm.

Se adjuntan, además, los niveles de la proteína por western blot del mismo anticuerpo.

- b) Western blot. Se utilizaron anticuerpos comerciales para ambas subunidades (BD Biosciences, San Diego, CA) con el fin de determinar la abundancia de Nox-2 /gp91_{phox} y p47_{phox}. Las muestras fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 7%, y corridas bajo condiciones reductoras. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF y marcadas con los respectivos anticuerpos (dilución 1/2000). La reacción antígeno-anticuerpo fue detectada por reacción con luminol (ECL, Amersham, Biosciences).

2.5 Comparación de los efectos

Las variaciones paramétricas se expresaron como promedio $\pm$ error estándar de la media y se compararán a través del test t de Student para muestras no pareadas, tomando como significativa toda diferencia en que $p < 0.05$. Para estudiar asociación entre variables se aplicó un análisis multivariado de regresión logística (ANOVA) con post test de Bonferroni. Los resultados se analizaron mediante el programa Stata versión 8.0 o Graph pad 4.0. El estudio inmunohistoquímico se analizó a través de un score semicuantitativo. La determinación de la cantidad de proteína se estableció por densitometría usando el programa Scion Image (Scion Corp., Frederick, MD, USA).

Resultados

1 Estado antioxidante.

Capacidad antioxidante del plasma y relación GSH/GSSG.

El grupo que fue suplementado muestra, en el postoperatorio inmediato, niveles de capacidad antioxidante (FRAP) y GSH/GSSG un 25% y 30% mayores que los correspondientes valores del grupo placebo, respectivamente (Ver Figura 1, 2). A nivel tisular, además, los valores de GSH/GSSG fueron 29% mayores en este grupo. En tanto los niveles plasmáticos de vitamina C en el postoperatorio inmediato y al alta fueron 25% y 37%

mayores en el grupo suplementado que en el grupo placebo, y 37% mayores comparados con los niveles basales al ingreso. Los niveles de tocoferol no mostraron diferencia en los valores respectivos por día de protocolo. (Ver Figura 3).

Enzimas antioxidantes

En el grupo suplementado CAT presenta en el día (-2) una actividad 20% menor que el valor basal al ingreso y una actividad 25 % menor que la del grupo placebo, tanto en el día de la cirugía como en el período postoperatorio inmediato (Ver Figura 4A). La SOD del grupo suplementado en el día (-2) presenta una actividad 20% menor que el valor basal al ingreso y 30% menor que la respectiva muestra del grupo placebo (Ver Figura 4B). La actividad de la GSH-Px los días (-2), día de la cirugía y postoperatorio inmediato fue alrededor de un 25% menor que el valor del placebo respectivo. Por su parte, la actividad en los días del postoperatorio inmediato y al alta, fue 52% y 47% mayor en los que recibieron placebo comparado con los valores basales, respectivamente (Ver Figura 4C).

Por otra parte, a nivel tisular, cabe destacar que la actividad de las enzimas CAT y GSH-Px fue un 55% y 45% mayor, en los pacientes suplementados que en los que recibieron placebo (Ver Tabla 4).

2 Marcadores de estrés oxidativo.

En cuanto a la lipoperoxidación en plasma y tejido, los niveles de malondialdehído al momento de la cirugía fueron 21% y 46% menores, respectivamente y los niveles plasmáticos de F2-isoprostanos, 27% menores en el grupo que recibió suplemento. (Tabla 4).

3 Abundancia y distribución de subunidad catalítica Nox-2 /gp91_{phox} y p47_{phox}.

En el tejido auricular hay menor expresión de la subunidad NOX-2/ gp91_{phox} y de la subunidad citosólica p47_{phox} en el grupo suplementado (Figura 5 A y B). La presencia de gp91_{phox} en la membrana plasmática de los cardiomiocitos se confirmó por inmunofluorescencia (patrón estriado y bajo el sarcolema). En la figura 6 se aprecia un patrón perinuclear que podría corresponder a marca de Golgi o retículo sarcoplasmático.

Figura 1. Capacidad antioxidante del plasma (FRAP). Expresada en $\mu\text{moles/L}$ de plasma para cada muestra de sangre

Figura 2. Glutación reducido (GSH)/oxidado (GSSG) en eritrocito. Expresada como el valor absoluto del cuociente de los valores de glutación (GSH) y glutación disulfuro (GSSG).

Figura 3. Niveles de Vitamina C plasmáticos. Expresados como μmoles de L-ascorbato/L de plasma.

Figura 4A. Actividad de Catalasa (CAT). Expresada en (K) /g Hb. * k, constante cinética de primer orden para la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno; Hb, hemoglobina.

Figura 4B. Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD). Expresada como USOD=1 unidad de SOD se definió como la actividad que dobla la autooxidación de la adrenalina. Hb, hemoglobina.

Figura 4C. Actividad de glutatión peroxidasa en eritrocito (GSH-Px). Expresada como U = 1. Unidad de GSH-Px se definió como la actividad que oxida 1 μ mol de NADPH por minuto. Hb, hemoglobina.

Los valores para cada determinación se expresan para cada grupo en promedio $\pm$ EE para muestras de pacientes sometidos a cirugía con CEC y separados en grupos placebo (N=15) y suplemento (N=15).

La diferencia fue estadísticamente significativa ^a v/s ingreso; * v/s grupo placebo, $p < 0.05$

5A

Expresión p47 en cardiomiocitos humanos

* Diferencia sig v/s control

5B

Expresión GP 91 en cardiomiocitos humanos

* Diferencia sig v/s control

Figura 5A y 5B. Expresión de subunidad p47 y GP91 en tejido auricular de pacientes controles en cardiomiocitos de pacientes sometidos a cirugía cardíaca con CEC en los grupos control (C), Placebo (P) y Suplemento (S). Diferencia en los valores de la cuantificación densitométrica: * v/s grupo placebo. $p < 0.05$.

Figura 6. Immunolocalización de gp91/Nox-2 en cardiomiocitos de pacientes controles. Imagen fluorescente verde con patrón estriado indica localización de la subunidad a nivel de sarcolema. Barra en amarillo indica escala de 5 μm. A.- Corte longitudinal, B.- Corte Transversal.

Discusión

Este estudio presenta la caracterización de un nuevo modelo de preconditionamiento no hipóxico del miocardio, basado en el reforzamiento del sistema de defensa antioxidante contra el daño oxidativo consecutivo a la cirugía cardíaca con CEC. Con respecto a los grupos de estudio, la distinta etiología quirúrgica, factores de riesgo y tratamiento farmacológico previo, permiten explicar la diferencia en los biomarcadores de estrés oxidativo en el grupo de

pacientes ingresados al protocolo.

Los biomarcadores de estrés oxidativo obtenidos en la población control reflejan que la cirugía provoca un aumento en el estado prooxidante sistémico, lo que concuerda con datos proporcionados por otros autores^{25, 32}. En los datos del presente trabajo, los menores valores de FRAP en plasma y relación GSH/GSSG en eritrocito en la muestra de sangre postoperatoria (<12 h) en el grupo placebo, darían cuenta de una menor eficacia de los mecanismos de defensa antioxidante extracelular e intracelular,

respectivamente, durante la cirugía, lo que se asocia a mayor injuria oxidativa, tanto a nivel de eritrocito como de tejido auricular. Cabe destacar, la mayor actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GSH-Px a nivel del eritrocito en el postoperatorio, reflejando una respuesta antioxidante precoz secundaria al incremento en la producción de ERO producidas por la reperfusión del tejido al final de la CEC. Estudios realizados en diferentes tipos celulares o con diferentes fuentes de radicales libres describen que la inducción de estrés oxidativo en un corto período de tiempo aumenta la actividad de algunas enzimas antioxidantes, seguido de una rápida disminución en sus valores, incluso llegando a niveles basales³³. Por lo tanto resulta razonable plantear una estrategia farmacológica con antioxidantes, con el fin de atenuar la magnitud del daño³⁴.

En el caso de estos marcadores en el curso de la intervención farmacológica, es importante destacar que el efecto de los Omega 3, previo a la incorporación de las vitaminas (muestra día -2), se puede interpretar como la inducción de un estrés oxidativo de un nivel que no causa injuria oxidativa importante, pero que es suficiente para despertar respuestas protectoras a nivel miocárdico durante el evento isquémico mayor. Lo anteriormente descrito, se apoya en los datos obtenidos en el día (-2), ya que tanto el glutatión reducido (GSH) como el FRAP son menores que los valores basales en el grupo que recibe el suplemento. Sin embargo, estos valores vuelven al nivel basal antes del alta, reflejando una injuria transitoria. Existen algunos trabajos en modelos celulares y en ratones donde se describe este efecto de los Omega-3 como inductores de mecanismos de defensa antioxidante a nivel del corazón, basados en aumento en la síntesis de enzimas antioxidantes y la potenciación de respuestas antiapoptóticas³⁵. Incluso, esta respuesta se debería a un efecto que no dependería tanto del tiempo de administración, sino que sería concentración dependiente³⁶. En cuanto a sus beneficios clínicos varios estudios prospectivos hacen particular referencia al papel de los omega 3 en prevención secundaria postinfarto basado en la menor incidencia de eventos isquémicos y muerte súbita^{18, 19}. Este efecto cardioprotector a largo plazo, ha sido explicado en base a distintos

mecanismos que incluyen: la competencia con el ácido araquidónico como sustrato de las ciclooxygenasas, el incremento en la fluidez de las membranas con su efecto sobre canales iónicos, y finalmente, la modulación de la elevación de calcio intracelular³⁷. Sin embargo, en vista de la sólida evidencia que involucra a las ERO en la injuria por reperfusión, no existen estudios que intenten explicar un potencial efecto antioxidante que proteja al miocardio del desarrollo de arritmias durante la reperfusión. En este contexto, los ácidos grasos Omega 3 podrían actuar directa o indirectamente como atrapadores de radicales libres producidos durante la repercusión, liberando ácidos grasos de membrana como respuesta a un incremento en la concentración de calcio intracelular o la generación de ERO³⁸.

Junto con los efectos a largo plazo, recientes reportes han demostrado que estos compuestos previenen el remodelamiento agudo durante una arritmia de alta frecuencia (por ejemplo, una fibrilación auricular), minimizando la persistencia de la arritmia³⁹.

Estudios posteriores han intentado extrapolar estos hallazgos a condiciones clínicas en períodos cortos. En pacientes sometidos a cirugía de bypass coronario, Calò y cols (2005) obtuvieron una significativa reducción de la incidencia de FAPO, sin embargo la interpretación mecanística de estos datos continúa siendo un problema no resuelto.

Por otra parte, en cuanto a la fuente de ERO en el corazón, los resultados preliminares indican que una de las principales vías de formación de anion superóxido es la NADPH oxidasa⁴⁰, cuyos niveles de expresión son detectables en la orejuela derecha de los controles y placebos humanos, siendo menores en el grupo suplementado con vitaminas y Omega 3 (Figuras 5A y B). La producción de superóxido también es detectable en tejido, siendo parcialmente inhibida por difenilidonio (DPI) (Datos no mostrados).

En cuanto a la localización de esta enzima, se comprobó que la subunidad catalítica Nox-2 se encuentra en la membrana plasmática del cardiomiocito, lo que está descrito para otros subtipos celulares como el macrófago y la célula endotelial (Figura 6)⁴¹. Es importante destacar que en el caso de la actividad oxidasa de esta enzima, recientes estudios la han categorizado como el principal factor predictor asociado

a complicaciones después de la cirugía con CEC, como es el caso de la FAPO⁷, sustentando aún con más fuerza el papel del estrés oxidativo en la patogenia de esta arritmia.

Debido a que el procedimiento de preconditionamiento farmacológico aplicado en este estudio posee efectos sistémicos, la principal limitación del presente estudio consiste en que no fueron evaluados blancos importantes de los fármacos utilizados. Debiera tenerse en consideración que los biomarcadores detectados en sangre pueden ser el resultado del efecto metabólico gatillado en otros órganos tales como hígado, riñón y cerebro, entre otros, y no solamente en el tejido cardíaco.

Como conclusión, los datos obtenidos demuestran la ocurrencia de estrés oxidativo en pacientes sometidos a cirugía cardíaca con CEC, tanto a nivel del tejido auricular como a nivel sistémico. La suplementación con Omega 3 y vitaminas antioxidantes

atenuaría el daño oxidativo. Una de las hipótesis que podría plantearse es que este efecto obedecería al menos en parte a una regulación negativa de la actividad de la NADPH oxidasa de los cardiomiocitos. Por lo tanto esta enzima destaca como un importante blanco terapéutico en el caso de nuevas intervenciones farmacológicas basadas en este modelo de preconditionamiento no hipóxico.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONDECYT), Grant 1070948. También la beca CONICYT, apoyo de realización de Tesis Doctoral 2008 N° 24080117. FONDECYT 1080497.

Se agradece la colaboración técnica de los Sres Diego Soto y Luis Montecinos, en la realización de los ensayos bioquímicos.

Referencias

1. LAMBETH J. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 332-347.
2. BECKER L. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 461-470.
3. CAI H, GRIENDLING K, HARRISON D. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 471-478.
4. HSIEH T, ZHANG S, FILEP J, TANG S, INGELFINGER J, CHAN J. High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 2002; 143: 2975-2985.
5. BELTOWSKI J, WOJCICKA G, MARCINIAK A, JAMROZ A. Oxidative stress, nitric oxide production, and renal sodium handling in leptin-induced hypertension. *Life Sci* 2004; 74: 2987-3000.
6. GUGGILAM A, HAQUE M, LUCCHESI P, FRANCIS J. Cytokines modulate oxidative stress in ischemia reperfusion-induced heart injury in rats: Role of gp91^{phox} and its homologs, Nox1 and Nox4. *FASEB Journal* 2006; 20: A1155.
7. KIM Y, KATTACH H, RATNATUNGA C, PILLAI R, CHANNON K, CASADEI B. Association of atrial nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity with the development of atrial fibrillation after cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 68-74.
8. MURRY C, JENNINGS R, REIMER K. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.
9. BAKER J. Oxidative stress and adaptation of the infant heart to hypoxia and ischemia. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 423-429.
10. MARISCALCO G, KLEISY C, ZANOBINI M, BANACH M, FERRARESE S, BORSANI P, et al. Atrial fibrillation after isolated coronary surgery affects late survival. *Circulation* 2008; 118:1612-1618.
11. MURRAY K, MACE L, YANG Z. Nonantiarrhythmic drug therapy for atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2007; 4: S88-S90.
12. CALÒ L, BIANCONI L, COLIVICCHI F, LAMBERTI F, LORICCHIO M, DE RUVO E, et al. N-3 Fatty acids for the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:1723-1728.
13. ROBINSON J, STONE N. Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol* 2006; 98: 39i-49i.
14. LEIFERT W, JAHANGIRI A, MCMURCHIE E. Membrane fluidity changes are associated with the antiarrhythmic effects of docosahexaenoic acid in adult rat cardiomyocytes. *J Nutr Biochem* 2000; 11: 38-44.
15. JAHANGIRI A, LEIFERT W, KIND K, MCMURCHIE E. Dietary fish oil alters cardiomyocyte Ca²⁺ dynamics and antioxidant

- status. *Free Radic Biol Med* 2006; 40:1592-602.
16. PEPE S, MCLENNAN P. Dietary fish oil confers direct antiarrhythmic properties on the myocardium of rats. *J Nutr* 1996; 126: 34-42.
17. XIAO YF, KE Q, WANG SY, YANG Y, CHEN Y, WANG GK, et al. Electrophysiologic properties of lidocaine, cocaine, and n-3 fatty-acids block of cardiac Na⁺ channels. *Eur J Pharmacol*. 2004; 485: 31-41.
18. BURR M. Secondary prevention of CHD in UK men: the Diet and Reinfarction Trial and its sequel. *Proc Nutr Soc* 2007; 66: 9-15.
19. MARCHIOLI R, MARFISI RM, BORRELLI G, CHIEFFO C, FRANZOSI MG, LEVANTESI G, et al. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 1999; 354: 447-55.
20. CARNES C, CHUNG M, NAKAYAMA T, NAKAYAMA H, BALIGA R, PIAO S, et al. Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ Res* 2001; 89: E32-E38.
21. BENZIE I, STRAIN J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.
22. CHUNG W, CHUNG J, SZETO Y, TOMLINSON B, BENZIE I. Plasma ascorbic acid: measurement, stability and clinical utility revisited. *Clin Biochem*. 2001; 34: 623-627.
23. SOWELL A, HUFF D, YEAGER P, CAUDILL S, GUNTER E. 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* 1994; 40: 411-416.
24. HISSIN P, HILF R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74: 214-226.
25. OCHOA J, VILCHEZ M, MATAIX J, IBÁÑEZ-QUILES S, PALACIOS M, MUÑOZ-HOYOS A. Oxidative stress in patients undergoing cardiac surgery: comparative study of revascularization and valve replacement procedures. *J Surg Res* 2003; 111: 248-254.
26. AEBI H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-126.
27. NEBOT C, MOUTET M, HUET P, XU J, YADAN J, CHAUDIERE P. Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autooxidation of a tetracyclic catechol. *J Anal Biochem* 1993; 214: 442-51.
28. FLOHÉ L, GÜNZLER W. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114-21.
29. COLLINS C, QUAGGIOTTO P, WOOD L, O'LOUGHLIN E, HENRY R, GARG M. Elevated plasma levels of F2 alpha isoprostane in cystic fibrosis. *Lipids* 1999; 34: 551-556.
30. YOUNG I, TRIMBLE E. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 504-508.
31. HU T, RAMACHANDRARAO S, SIVA S, VALANCIUS C, ZHU Y, MAHADEV K., et al Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF-beta-induced cytoskeletal alterations in endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F816-F825.
32. FERREIRA R, FRAGA C, CARRASQUEDO F, HOURQUEBIE H, GRANA D, MILEI J. Comparison between warm blood and crystalloid cardioplegia during open heart surgery. *Int J Cardiol* 2003; 90: 253-60.
33. DHALLA N, ELMOSELI A, HATA T, MAKINO N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 446-56.
34. RODRIGO R, CASTILLO R, CERECEDA M, ASENJO R, ZAMORANO J, ARAYA J. Non-hypoxic preconditioning of myocardium against postoperative atrial fibrillation: mechanism based on enhancement of the antioxidant defense system. *Med Hypotheses* 2007; 69: 1242-1248.
35. JAHANGIRI A, LEIFERT W, PATTEN G, MCMURCHIE E. Termination of asynchronous contractile activity in rat atrial myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Mol Cell Biochem* 2000; 206: 33-41.
36. PEPE S, MCLENNAN P. Long chain PUFA dose-dependently increase oxygen utilization efficiency and inhibit arrhythmias after saturated fat feeding in rats. *J Nutr*. 2007; 137: 2377-2383.
37. LEIFERT W, JAHANGIRI A, MCMURCHIE E. Antiarrhythmic fatty acids and antioxidants in animal and cell studies. *J Nutr Biochem* 1999; 10: 252-267.
38. RICHARD D, KEFI K, BARBE U, BAUSERO P, VISIOLI F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacol Res* 2008; 57: 451-455.
39. DA CUNHA D, HAMLIN R, BILLMAN G, CARNES C. n-3 (omega-3) polyunsaturated fatty acids prevent acute atrial electrophysiological remodeling. *Br J Pharmacol* 2007; 150: 281-285.
40. KIM Y, GUZIK T, ZHANG Y, ZHANG M, KATTACH H, RATNATUNGA C., et al. A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res* 2005; 97: 629-636.
41. BEDARD K, KRAUSE K. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313.