

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION
INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO
SUBDIRECCION GENERAL MEDICA
SUBDIRECCION DE REGULACION Y ATENCION HOSPITALARIA
CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"
SERVICIO DE CIRUGÍA CARDIOTORACICA

**DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE ESTRÉS OXIDATIVO Y/O NITROSANTE EN
LOS PACIENTES PEDIÁTRICOS CON HIPERTENSIÓN PULMONAR
SECUNDARIA A COMUNICACIÓN INTERVENTRICULAR Y/O PERSISTENCIA
DE CONDUCTO ARTERIOSO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:
ESPECIALISTA EN CIRUGÍA CARDIOTORÁCICA
PRESENTA:
DR. FAUSTO CÉSAR GARCÍA HERNÁNDEZ.

No. Registro: 151.2012

MÉXICO, DF. FEBRERO 2013.

DRA. AURA ARGENTINA ERAZO VALLE SOLIS

Subdirectora de Enseñanza e Investigación del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”

DR. GUILLERMO DIAZ QUIROZ

Jefe de Servicio de Cirugía Cardiorácica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

DR. ABEL ARCHUNDIA GARCIA

Asesor clínico de tesis y Profesor titular del Curso de Especialización en Cirugía Cardiorácica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

DR. JOSE LUIS ACEVES CHIMAL

Jefe de Enseñanza e Investigación de la Coordinación de Servicios modulares.

DRA. SANDRA PATRICIA ANTÚNEZ SÁNCHEZ

Asesor clínico y Médico adscrito al servicio de ecocardiografía pediátrica.

DR. JOSÉ GUTIÉRREZ SALINAS

Asesor técnico y adscrito al Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica.

DR. FAUSTO CÉSAR GARCÍA HERNÁNDEZ

Autor y médico residente del Curso de Postgrado de Cirugía Cardiorácica.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme, culminar este proyecto de su obra.

A mis maestros por darme desinteresadamente su conocimiento.

A mis familiares por todo su apoyo y comprensión durante todo mi camino.

A mis amigos quienes han permanecido leales a pesar de la distancia.

A Magdalena González García por su apoyo incondicional en todos los aspectos y por emprender juntos este nuevo camino del matrimonio.

Al técnico de laboratorio Sergio Hernández Rodríguez por su valiosa ayuda en las labores técnicas de esta tesis.

Al Dr. José Luis Gutiérrez Salinas por su conocimiento y dirección durante el desarrollo de este trabajo.

Índice de tablas y figuras	Pagina
Cuadro 1.....	22
Figura 1.....	23
Figura 2.....	24
Figura 3.....	25

CONTENIDO

	Página
Página de aprobación.....	II
Registro.....	III
Agradecimientos.....	IV
Índice de Tablas y figuras.....	VI
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Palabras clave.....	3
Marco teórico.....	4
Planteamiento del problema.....	9
Justificación.....	10
Hipótesis.....	11
Objetivo.....	12
Tipo de estudio.....	13
Materiales y métodos.....	14
Resultados.....	17
Discusión.....	19
Conclusión.....	20
Anexo.....	30

RESUMEN

Introducción: La hipertensión pulmonar en niños, secundaria a comunicación interventricular y/o persistencia del conducto arterioso es una situación que produce alteraciones generales en el organismo caracterizadas por reactividad importante en el sistema vascular cardio-pulmonar. En modelos experimentales se ha comprobado que existe estrés nitrosante que acompaña a la HP por lo que el objetivo del presente trabajo es detectar la presencia de éste tipo de condiciones metabólicas en niños que presentan esta patología. **Material y Métodos:** A niños (0 a 5 años) que tienen diagnóstico clínico de HP secundario a comunicación interventricular, se les tomó una muestra de sangre para aislar el plasma en donde se determinó por métodos espectrofotométricos usando kits comerciales, la concentración de malondialdehído (MDA), nitratos totales (NOx) y el estatus antioxidante total (EAT). Como grupo control, se tomaron muestras de sangre en niños sin patología cardio-vascular, pareados en edad al grupo en estudio.

Resultados: La concentración de MDA en los niños con HP presenta un incremento estadísticamente significativo de 2.55 veces respecto al grupo control ($p < 0.05$), al igual que el EAT que presenta un incremento del 14%. Por otro lado, la concentración de NOx es 1.42 veces menor en los pacientes con HP en comparación con el grupo control. **Conclusiones:** Nuestros resultados muestran que los niños con HP presentan alteraciones en su balance nitrosativo, indicativos de la presencia de un estrés nitrosativo secundario a su patología de base que puede alterar el resto del organismo, principalmente al sistema circulatorio.

Palabras clave: malondialdehído, hipertensión pulmonar (HP), nitratos totales (NOx).

ABSTRACT: Pulmonary hypertension in children secondary to ventricular septal defect is a condition that causes changes in the organism, characterized by hyperactivity in the cardiopulmonary system. In experimental models it was found that there is nitrosative stress accompanying the PH. The aim of this study is to detect this type of metabolic conditions in children with this disease. **Material and Methods:** One took a sample of blood in children (0-5 years) with a diagnosis of PH secondary to septal defect by spectrophotometric methods to determine the concentration of malondialdehyde (MDA), total nitrate (NOx) and antioxidant status total (EAT). As a control group, children were sampled without cardiovascular disease, age-matched to the group under study. **Results:** The concentration of MDA in children with PH presents a statistically significant increase, 2.55 times compared to the control group ($p < 0.05$), as did the EAT with an increase of 14%. Moreover, the NOx concentration is 1.42 times lower in patients with PH compared to the control group. **Conclusions:** We conclude that children with PH manifest alterations in nitrosative balance, indicative of nitrosative stress secondary to the underlying pathology that can alter the rest of the organism, especially the circulatory system.

PALABRAS CLAVE:

EAT: Estatus antioxidante total.

MDA: Malondialdehido.

NOX: Nitratos totales (determ. Óxido nítrico)

SOD: superóxido dismutasa.

Glt-px: Glutación peroxidasa.

S-nitroso-Hb: S-nitroso-hemoglobina.

CIV: Comunicación interventricular.

PCA: Persistencia de conducto arterioso.

HP: hipertensión pulmonar.

HP-s: hipertensión pulmonar secundaria.

MARCO TEÓRICO

La etiología de la hipertensión pulmonar basada en la clasificación más reciente de la Organización Mundial de la Salud (WHO) incluye 5 categorías: 1) hipertensión arterial pulmonar (PAH), 2) PH asociada con enfermedad cardíaca izquierda, 3) PH asociada con enfermedad pulmonar y/o hipoxemia, 4) PH asociada con enfermedad tromboembólica crónica y 5) PH asociada con otros desordenes, incluidos PAH idiopática, PAH familiar, PAH asociada con enfermedad de la colágena vascular, cortos sistémico-pulmonares congénitos, hipertensión portal, HIV, drogas/toxinas y otras condiciones tales como telangiectasia hemorrágica hereditaria (Síndrome Osler-Weber-Rendu) y hemoglobinopatías (1-5).

La característica de la PH es el desarrollo del incremento de la resistencia vascular pulmonar que conduce a incremento de la postcarga del ventrículo derecho, progresión a falla cardíaca derecha y muerte sin tratamiento.

Los síntomas más frecuentes son disnea de esfuerzo, angina, síncope o presíncope, astenia, fenómeno de Raynaud. Los signos más frecuentes: segundo ruido reforzado en foco pulmonar, galope ventricular derecho por cuarto tono, frémito palpable en borde esternal izquierdo (hipertrofia ventricular derecha), Pulso venoso con onda "a", Pulso venoso con onda "v", Presión venosa yugular elevada, Soplo de Graham-Steell, Signos de insuficiencia cardíaca derecha, Galope ventricular derecho por tercer tono (3-10).

Diagnóstico y valoración: El objetivo de las pruebas diagnósticas en los pacientes con sospecha de HP es excluir causas secundarias y valorar la gravedad de la HP. *Determinaciones analíticas:* pruebas funcionales hepáticas, serología de VIH y serologías para excluir enfermedades del tejido conectivo. *Radiografía de tórax:* aparecen unas arterias pulmonares centrales prominentes con disminución de la vascularización periférica junto con crecimiento de aurícula y ventrículo derechos. En el 6% de los casos la radiografía de tórax es normal.

Ecocardiografía: descarta enfermedades congénitas, valvulares y miocárdicas, y puede proporcionar una estimación de la presión sistólica pulmonar útil para valorar de forma no invasiva la respuesta al tratamiento (5-20).

Pruebas funcionales respiratorias: descartan trastornos significativos del parénquima pulmonar o de las vías respiratorias. En la mayoría de los casos la gasometría arterial presenta una hipoxemia con hipocapnia causada por un desequilibrio de ventilación-perfusión. (10-33).

Pruebas de esfuerzo cardiopulmonar: revelan un patrón de función cardíaca alterada, con reducción del consumo máximo de oxígeno, elevación de la ventilación minuto, un umbral anaeróbico bajo y un pulso de oxígeno reducido. Existe buena correlación entre la distancia recorrida en el test de los seis minutos caminando y el pronóstico de la hipertensión pulmonar. Es la prueba que mejor evalúa la situación funcional permitiendo realizar una monitorización no invasiva de la respuesta al tratamiento. (10-33).

Gammagrafía de ventilación-perfusión pulmonar: es normal, o presenta defectos subsegmentarios, particularmente en la enfermedad veno-oclusiva, en contraste con los grandes y múltiples defectos de perfusión típicos de la hipertensión pulmonar de origen tromboembólico. (10-33).

Arteriografía pulmonar: es útil cuando la gammagrafía de perfusión pulmonar no es concluyente y es de obligada realización cuando existen defectos de perfusión segmentarios o subsegmentarios en la gammagrafía que sugieren enfermedad tromboembólica crónica de grandes vasos.(10-33).

Tomografía computarizada (TC) y Resonancia Nuclear Magnética: se recomienda realizar un TC de alta resolución cuando la capacidad pulmonar total es $\leq 70\%$ o el coeficiente de difusión es $\leq 50\%$ para evaluar el parénquima pulmonar y descartar la presencia de enfermedad intersticial pulmonar y enfermedad veno-oclusiva.(10-33).

Biopsia pulmonar: en general se considera que conlleva un riesgo elevado sin que exista evidencia de que aporte información clínica adicional. Sólo estaría justificada en determinadas situaciones específicas individualizadas, como el diagnóstico de vasculitis activa.(10-33).

Cateterismo cardíaco: se caracteriza por un marcado de la presión, aumento de la presión de la aurícula derecha y un gasto cardíaco bajo. Las presiones del lado izquierdo del corazón habitualmente son normales. La presión de enclavamiento pulmonar es generalmente normal, incluso en la enfermedad veno-oclusiva, debido a la permeabilidad de las grandes venas pulmonares y a la naturaleza parcheada de la enfermedad en las venas.(10-33).

Test agudo con vasodilatadores: predice la respuesta a largo plazo con tratamiento vasodilatador oral. Se recomienda realizarlo a todos los pacientes para determinar la capacidad de respuesta al tratamiento vasodilatador. Los fármacos recomendados son: el epoprostenol intravenoso, el óxido nítrico inhalado y la adenosina intravenosa. Aunque no existe consenso en la definición de los pacientes que se consideran respondedores se puede aceptar la siguiente división según los hallazgos objetivados durante el test:(10-33).

1. *Respondedores:* reducción de PAPm $\geq 20\%$ o una disminución de la PAPm ≥ 10 mmHg, con aumento o mantenimiento del gasto cardíaco (GC). Suponen aproximadamente un 20% de todos los pacientes con HP, presentando una alta probabilidad de mejoría clínica y hemodinámica tras tratamiento vasodilatador oral junto con mayor supervivencia.(10-33).

2. *Respondedores de resistencia:* reducción de las RVP $> 20\%$ sin reducción significativa de la PAPm (la reducción se produce a expensas de un aumento del GC). No se conoce su significado. No se benefician del tratamiento vasodilatador por vía oral. (10-33).

3. *No respondedores:* reducción de las RVP $< 20\%$ sin reducción significativa de la PAPm. No se recomienda el tratamiento vasodilatador con calcio antagonistas por vía oral, ya que no altera el curso clínico ni la supervivencia.(10-33).

4. *Respuesta desfavorable:* caída de la presión arterial sistémica media $> 20\%$ con mantenimiento o disminución del GC. El tratamiento vasodilatador está contraindicado.(10-33).

El pronóstico de la HPP sin tratamiento es malo, siendo la media de supervivencia tras el diagnóstico de 2,5 años. Actualmente las recomendaciones se dirigen principalmente hacia un diagnóstico precoz de la enfermedad para una instauración del tratamiento en una fase más temprana de la enfermedad como intento de mejorar el pronóstico a largo plazo (10-33).

Indicadores de mal pronóstico en la HP

Clase funcional NYHA III-IV
PAPm > 85 mmHg
PADm > 20 mmHg
IC < 2 l/min/m ²
Sat O ₂ AP < 63%
Distancia recorrida en el test de los seis minutos <300 metros Ausencia de respuesta vasodilatadora en el test agudo PAPm: presión media de arteria pulmonar; PADm: Presión media de aurícula derecha; IC: índice cardíaco; Sat O ₂ AP: saturación de oxígeno de arteria pulmonar; mmHg: milímetros de mercurio; l: litros; min: minuto; m ² : metro cuadrado. (10-33).

Por otro lado, técnicamente hablando, un radical libre es un átomo o una especie molecular reactiva que presenta un electrón desapareado en su orbital más exterior. Esta característica les confiere alta reactividad química y, por ello, pueden alterar a las principales biomoléculas de la célula. Durante el metabolismo oxidativo de la célula, el oxígeno que se respira es conjugado con hidrógeno y electrones para formar agua en la cadena respiratoria de las mitocondrias de todos los tejidos. Se estima que cerca de 5% del oxígeno que se consume en la célula llega a formar radicales libres y, puesto que se ha comprobado que durante los procesos fisiopatológicos de muchas enfermedades se realiza un alto consumo de oxígeno, la producción de radicales libres se incrementa exponencialmente y los sistemas naturales antioxidantes llegan a ser superados, con lo que puede provocarse daño a la célula (35-43).

Por otro lado, existe otro conjunto de moléculas que son derivadas del nitrógeno y que bajo ciertas circunstancias, también son responsables de la generación de radicales libres pero derivados del nitrógeno por lo que se conocen con el nombre genérico de radicales libres derivados del nitrógeno de los cuales, el óxido nítrico (NO por sus siglas en inglés) es el principal representante y actor metabólico en el ser humano (44-48).

El óxido nítrico es una molécula gaseosa que participa en la señalización de diferentes procesos biológicos. Es un radical libre con una vida media de 4 a 8 segundos en medio acuoso oxigenado. Descrito como un gas lábil, capaz de libre difusión en las membranas celulares, tal característica colabora con su alta actividad biológica. Se ha descrito que el NO participa en diversos procesos fisiológicos y bioquímicos tales como acción antioxidante, antiinflamatoria, anticoagulante, profibrinolítica, inhibitoria de la adhesión y migración de leucocitos, inhibitoria de la proliferación y migración de las células musculares lisas, inhibitoria de la agregación y adhesión plaquetaria (44-48). El óxido nítrico (NO), que puede ser producido por prácticamente todas las células del endotelio vascular en donde se

ha descrito que actúa como regulador paracrino, autocrino e intracrino de la función vascular y cardíaca a través de acciones directas sobre los cardiomiocitos y de acciones indirectas, consecuencia de sus efectos vasculares. En el miocardio, el NO regula, entre otros procesos, el acoplamiento excitación-contracción, la frecuencia cardíaca, el tono vegetativo, la respiración mitocondrial (metabolismo energético), los procesos de hipertrofia y apoptosis, y la fase tardía del preconditionamiento isquémico. A escala vascular, el NO regula el tono vascular, la perfusión coronaria, la permeabilidad capilar y la agregación plaquetaria y, además, desempeña un importante papel en el control de la angiogénesis, la inflamación y la proliferación celular vascular. La regulación de todos estos procesos es sumamente compleja y depende no sólo de las concentraciones de NO, sino también del compartimiento celular donde se esté generando y de la vía de señalización activada, la situación fisiopatológica analizada, el estado redox celular y la presencia de otros mediadores celulares (acetilcolina, noradrenalina, bradicinina, angiotensina, etc.)⁽⁴⁴⁻⁴⁸⁾.

El cuerpo humano y la célula en general poseen varios sistemas antioxidantes para nulificar la posible acción nociva de los radicales libres. Estos sistemas de defensa dependen mucho de los antioxidantes proporcionados por la dieta, la cual debe aportar vitaminas y minerales que mantienen la plétora de antioxidantes celulares así como la producción endógena de moléculas antioxidantes, como el glutatión. Así, por ejemplo, las vitaminas C, E y los β carotenos son las principales vitaminas antioxidantes que la célula toma de los alimentos y que le auxilian en la eliminación de los radicales libres. También hay una serie de enzimas conocidas con el nombre genérico de enzimas antioxidantes, que eliminan directamente los radicales libres y evitan el daño que pudiesen provocar a la célula y al organismo en general ⁽⁴⁵⁻⁵³⁾. El daño a la célula y a los tejidos en general causado por la generación de radicales libres pueden ser de tal magnitud que se establezca el llamado estrés oxidativo el cual produce cambios irremediables en la célula que pueden provocarle un fenómeno de apoptosis o muerte celular programada. El monitoreo del daño por la acción de radicales libres puede ser dado mediante la determinación de los siguientes procedimientos generales ⁽⁵⁴⁻⁵⁸⁾.

a) Determinación de productos o subproductos del daño a las biomoléculas. Los radicales libres derivados del oxígeno pueden reaccionar con lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos y producir diversos derivados secundarios que son determinados en el laboratorio como muestra de dicho daño. Dentro de éstos productos se encuentra el malondialdehído (MDA) el cual es un producto del ataque de los radicales libres sobre los lípidos insaturados de la célula y cuya determinación es considerada como un buen indicador de daño por radicales libres. De la misma manera, la producción de peroxinitritos es considerada como un buen indicador del daño a las proteínas causada por los radicales libres y del mismo modo, la determinación de nitritos totales es un indicador de la presencia del óxido nítrico el cual se considera un radical libre que se produce en exceso durante un estrés oxidativo. Por otro lado, tal como ha sido mencionado, los radicales libres pueden dañar a las proteínas de la célula y producir ya sea su

agregación o su ruptura las cuales son observadas cuando son analizadas por medio de geles de acrilamida ya sea para proteínas con alto peso molecular o de bajo peso molecular. La alteración de los patrones electroforéticos de las proteínas analizadas es una demostración de los cambios moleculares inducidos por los radicales libres en dichas proteínas (54-58).

b) Determinación de elementos antioxidantes. Para contener el ataque de los radicales libres a las biomoléculas, la célula posee los llamados antioxidantes los cuales eliminan o modifican la actividad de los radicales libres para que no sean dañinos a la célula. De ellos, se reconocen varios sistemas de los que destacan las enzimas antioxidantes de las cuales la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa son las principales. Si la producción excesiva de radicales libres supera las barreras antioxidantes de la célula, se establece un estrés oxidativo que puede producir la activación de la muerte celular programada o apoptosis(45-58).

PROBLEMA

La hipertensión pulmonar desencadena una serie de alteraciones estructurales y funcionales en la vasculatura pulmonar. Diferentes autores informan que estas alteraciones específicamente en lo concerniente al estrés nitrosativo son mucho más graves en pacientes con hipertensión pulmonar primaria, pero se desconoce el comportamiento de este estrés en pacientes con la misma patología pero secundaria a CIV y PCA.

JUSTIFICACION

La hipertensión pulmonar modifica importantemente la calidad de vida de los pacientes que la padecen. En la población pediátrica, esta enfermedad pulmonar generalmente se presenta como consecuencia de hiperflujo pulmonar asociado a comunicación interventricular y persistencia del conducto arterioso. En la actualidad existen pocas herramientas terapéuticas con las cuales paliar el impacto de la enfermedad pulmonar en la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Se ha explorado poco las alteraciones que se presentan en el proceso de oxidación pulmonar, las cuales pudieran estar importantemente modificadas en casos de hipertensión pulmonar, por lo que proponemos el presente estudio, para identificar las diferencias en el equilibrio del estrés oxidativo /nitrosativo, considerando que la información obtenida servirá de base para la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas para esta enfermedad pulmonar.

HIPÓTESIS

Es probable que en pacientes pediátricos con hipertensión pulmonar secundaria a CIV y PCA, presenten un estrés oxidativo y/o nitrosante como parte de sus componentes fisiopatológicos y que explique en parte el daño general a su organismo, que tienen este tipo de pacientes. Se podrá valorar un tratamiento coadyuvante con cierto grado de certidumbre, el nivel de estrés oxidativo y/o nitrosante mediante la determinación de los radicales libres derivados del metabolismo del oxígeno y/o nitrógeno con análisis de las muestras sanguíneas de pacientes pediátricos que están diagnosticados con comunicación interventricular y/o persistencia del conducto arterioso.

OBJETIVOS

General

El objetivo principal de este estudio está orientado a determinar un estrés oxidativo y/o nitrosante mediante la detección en muestras de sangre, de metabolitos relacionados con dichas condiciones, en niños que presentan una hipertensión pulmonar secundaria a comunicación interventricular junto con PCA

Específicos

1. Determinar en muestras de sangre provenientes de niños que presentan una hipertensión pulmonar secundaria a comunicación interventricular junto con PCA, las concentraciones de malondialdehído, el estatus antioxidante total y el glutatión total como indicadores de la presencia de un estrés oxidativo y/o nitrosante.
2. En ese mismo grupo de pacientes, determinar en muestras de sangre la concentración de nitratos totales y la actividad específica de las enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa como indicador de la presencia de estrés oxidativo y/o nitrosante.
3. Determinar la probable asociación entre la presencia de hipertensión pulmonar secundaria a comunicación interventricular junto con PCA y los metabolitos indicativos de estrés oxidativo y/o nitrosante.

TIPO DE ESTUDIO

DISEÑO: Trasversal, observacional, descriptivo, analítico tipo piloto.

POBLACION DE ESTUDIO: Pacientes pediátricos con hipertensión arterial pulmonar secundaria a CIV y PCA atendidos en el servicio de cardiología pediátrica y cirugía cardiotorácica del CMN 20 de noviembre.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Selección de la población en estudio.

Se seleccionaron pacientes pediátricos con hipertensión pulmonar secundaria a cardiopatía congénita atendidos en el servicio de Cardiología Pediátrica y cirugía cardiotorácica del CMN 20 de Noviembre. A los padres o tutores legalmente responsables se les explico las características del estudio y se firmó carta de consentimiento informado.

Toma de muestras de sangre y su procesamiento.

Se tomaron con ayuno de 12 horas de los sujetos de estudio. Mediante venopunción en vena cefálica o basílica de cualquiera de los brazos se obtuvieron 10 ml de sangre y se depositaron en tubos con anticoagulante (EDTA), manteniéndolas en refrigeración a 4 GC. Se centrifugaron a 1500 rpm por 15 min para obtener el plasma el cual fue colocado en viales y congelado a -70°C .⁽⁵⁹⁾

Determinación de la concentración de nitratos totales.

Los niveles de óxido nítrico (NOx) se determinaron con kit comercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) con el procedimiento propuesto por Cortas y Wakid:⁽⁶⁰⁾ Se filtró el plasma a $0.22\ \mu\text{m}$ (Millex-GV, PVDF-durapore, Millipore Co, Bedford M.A. U.S.A.) y posteriormente fue desproteinizado agregando cuatro volúmenes de solución de sulfato de zinc (75 mM) e hidróxido de sodio (55 mM) agitando brevemente y centrifugando a 5000 rpm por 10 minutos para recuperar el sobrenadante. Un volumen del sobrenadante fue usado para su derivación con gránulos activados de cadmio siguiendo el procedimiento de Cortas y Wakid ⁽⁶⁰⁾. Obtenido el derivado de nitratos, se tomó un volumen y se mezcla con 2.5 volúmenes de agua bidestilada, un volumen de sulfanilamida (3% p/v en HCl 0.4N) y de N-naptiletilendiamina (0.1% p/v en agua bidestilada). La mezcla se agitó brevemente y se dejó incubar 30 minutos al termino de los cuales, se analizó a 540 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6300, Cielovista, Cal. USA).

Determinación de malondialdehído.

Para determinar el índice de Lipoperoxidación se determinó la concentración de malondialdehído (MDA) en las muestras de plasmas mediante un kit de reactivos comerciales (MyBiosource, Cal, USA) basado en el método descrito por Ohkawa ⁽⁶¹⁾: En un tubo de ensayo se colocaron 200 μ L de suero junto con 1.5 mL de ácido acético (20%) y 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico (0.8% en agua). Se mezcla a homogeneidad y se coloca en agua a ebullición por 60 minutos al término de los cuales se agregó 1 mL de agua bidestilada y 5 mL de butanol/piridina (15:1 v/v) agitándose vigorosamente. La muestra fue centrifugada por 10 minutos a 2500 rpm recuperándose el sobrenadante el cual fue leído a 545 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6300, Cielovista Cal. USA) calculando la concentración de MDA a partir del coeficiente de extinción ($1.54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y expresando la concentración en nmol/mg proteína total.

Determinación del estatus antioxidante total.

El estatus antioxidante total (EAT) fue determinado en muestras de plasma (20 μ L) usando el kit de reactivos de Calbiochem (Calbiochem; Cat. No. 615700) que esta basado en la capacidad que tiene la muestra de inhibir la oxidación del ABTS (2,2'-azido-di-(3-etilbenzen-thiazolidina sulfonato) haciendo la lectura a 600 nm en un espectrofotómetro (Jaenway 6300, Cielovista Cal. USA) y expresando el resultado en concentración mili molar.

Determinación de la concentración de proteína.

En todos los casos, la concentración de proteína fue determinada usando el método descrito por Lowry ⁽⁶²⁾ usando albúmina de suero bovino como estándar ⁽⁵⁹⁻⁷⁰⁾.

Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados usando como base una hoja de cálculo del programa Excel (Microsoft Corporation, USA) y el programa estadístico GraphPad Prism V-4.00 (GraphPad Software, San Diego, Cal., U.S.A.). Los resultados cualitativos fueron analizados usando tablas de contingencia y prueba de Yates. Los datos cuantitativos fueron analizados por suma de rangos de wilcoxon (t student modificada). Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS.

Analizamos 43 pacientes con una edad de 4 mes a 5 años. Del grupo con HP (n=23) 16 fueron del sexo femenino y 7 del masculino. Del grupo control (n=20) 12 fueron femeninos y 8 masculinos. La Tabla 1 muestra las características generales de los niños con HP y los del grupo control. Como puede observarse, los niños que presentan HP tienen alteraciones vasculares compatibles con la presencia de HP, que es secundario a la presencia de comunicación interventricular que es su patología de base. Como se muestra en dicha tabla, los síntomas y signos de predominio cardio-pulmonar se encuentran presentes en diversas proporciones entre los niños con el padecimiento de base y que desarrollaron HP.

Por otro lado, la Figura 1 muestra las concentraciones de nitratos totales (NOx) en ambos grupos en estudio. Se considera a la determinación de NOx como un indicador directo de la producción de óxido nítrico en el organismo. Por lo que, de acuerdo con lo que se muestra en la Figura 1, los niños que presenta HP presentan una disminución en la concentración plasmática de NOx estadísticamente significativa del 31.57% en comparación con el grupo control (376.5 ± 39.19 nmol/L vs 257.62 ± 22.48 nmol/L; $p < 0.05$, respectivamente), lo que se interpreta como una menor producción de óxido nítrico en los niños que presentan esta patología.

Por otro lado, en la Figura 2 se muestra el promedio de las concentraciones de MDA tanto en el grupo control como en el que tiene HP. La determinación de la concentración de este metabolito es considerada un buen índice de daño a los lípidos poliinsaturados por acción directa de los radicales libres derivados del oxígeno, por lo que podemos observar que dicho daño es mayor en los pacientes con HP ya que presentan un incremento de hasta 2.39 veces con respecto al grupo control (0.59 ± 0.11 nmol/mg prot vs 1.41 ± 0.27 nmol/mg prot; $p < 0.05$, respectivamente), indicando un gran daño al organismo.

Además, la Figura 3 muestra la determinación del estatus antioxidante total realizada en las muestras obtenidas del grupo control y los que presentaron HP.

En este caso, se observa que existe un incremento en el estatus antioxidante total del 15.03% en el grupo con HP en relación con el grupo control (2.074 ± 0.062 mM vs 1.803 ± 0.051 ; $p < 0.05$, respectivamente).

Por otro lado, puesto que el estatus antioxidante total muestra la condición del balance oxidativo dependiendo del equilibrio entre los oxidantes y antioxidantes que se producen en el organismo en un momento determinado, se ha empleado la asociación o relación de este estatus total con la concentración de metabolitos que potencialmente son oxidativos o dañinos para el organismo. De esta forma, la Figura 4 muestra la correlación entre el estatus antioxidante total y las concentraciones de nitratos totales y MDA tanto en los niños del grupo control como los que presentan HP. Como se puede observar, los niños del grupo control muestran una asociación positiva entre el estatus antioxidante total y las concentraciones de MDA y de nitratos totales ($r = 0.31$ y $r = 0.32$; para ambos $p < 0.05$; respectivamente) (Figura 4 A y B; respectivamente). Por el contrario, los niños que presentan HP muestran una asociación negativa ($r = -0.59$; $p < 0.05$) entre el estatus antioxidante total y la concentración de nitratos totales así como una asociación positiva ($r = 0.47$; $p < 0.05$) entre el estatus antioxidante total y la concentración de MDA (Figura 4, C y D; respectivamente).

DISCUSIÓN.

Nuestros resultados muestran que existe una alteración importante en el balance oxidativo en los niños que presentan hipertensión arterial pulmonar secundaria a la presencia de comunicación interventricular. Esta alteración en el balance se debe principalmente a la presencia de un exceso en la concentración de MDA así como una marcada disminución en la concentración de nitratos totales y que, ambos, están en asociación directa con el estatus antioxidante total.

Se ha considerado que la determinación de la concentración de nitratos totales es una medida de la presencia de óxido nítrico el cual es producido por las células endoteliales del sistema vascular arterial y que tiene un conocido efecto vasodilatador además de otras funciones metabólicas por ser también reconocido como una molécula de señalización intracelular (11-15). Es por ello que su concentración en el organismo debe ser regulada en forma muy precisa para evitar alteraciones metabólicas y fisiológicas generales que induzcan un cambio importante del tono vascular que origine ya sea un proceso de hipertensión o de hipotensión generalizada ya sea por la falta o el exceso (respectivamente) del óxido nítrico. En modelos experimentales se han descrito situaciones en las cuales se produce un exceso en la producción de óxido nítrico el cual origina una vasodilatación, mientras que, una disminución en la producción de este metabolito produce una vasoconstricción; ambas situaciones están asociadas a proceso de hipoxia-reperfusión que afecta a los tejidos en general (11-12,14,23-26).

Ha sido descrito que la presencia de un proceso de hipoxia-reperfusión en los tejidos origina diversas clases de alteraciones metabólicas, principalmente las relacionadas con la producción de radicales libres derivados del oxígeno y los derivados del nitrógeno (principalmente óxido nítrico)(11-14, 23-26). De esta forma, se ha descrito en modelos experimentales que patologías cardíacas y pulmonares que originan una condición de hipoxia-reperfusión en forma continua, producen alteraciones en el balance oxidativo y en las concentraciones de los principales metabolitos indicadores de daño oxidativo como son el MDA y los nitratos totales (23-28). Así, se ha descrito en este tipo de modelos que, durante la

fase de hipoxia tisular, se produce un incremento importante en la producción de nitratos totales (y por tanto, de nitrógeno) y en la fase de reperfusión existe un incremento importante de MDA (es decir, de radicales libres derivados del oxígeno) lo que indica un daño oxidativo al organismo (23-28).

NUESTROS HALLAZGOS CONFIRMAN LO ANTES MENCIONADO Y CONSIDERAMOS que este hecho puede OBECEDER A una disminución importante en la expresión vascular de la enzima óxido nítrico sintetasa (principal enzima encargada de la síntesis del óxido nítrico) causada por la patología cardiopulmonar de base que presentan este tipo de pacientes. Lo anterior esta apoyado por la observación de que procesos patológicos agudos o crónicos fatales pueden originar una disminución en la expresión de esta enzima con la consiguiente disminución en la producción de óxido nítrico y con ello aumentar el tono vascular general y/o local (28-30).

Aunado a lo anteriore se ha reportado que cuando el balance nitrosativo (producción de óxido nítrico) se altera, se produce un exceso en la producción de radicales libres derivados del oxígeno los cuales pueden incrementar el daño general al organismo (11,13,14,16,18,26,27). Sin embargo; en los pacientes incluidos en este estudio no se midió el grado de daño pulmonar que existe debido al propósito y diseño del mismo. podemos hipotetizar que el desarrollo de hipertensión arterial pulmonar secundario a hiperflujo pulmonar origina un proceso de oxidación que no puede ser compensada por los sistemas antioxidantes del organismo puesto que encontramos una correlación inversa entre el estatus antioxidante total y las concentraciones de MDA y nitratos totales, representando estos metabolitos, indicadores importantes de daño general al organismo por la presencia de radicales libres derivados del oxígeno y, en el caso de los nitratos totales, como un indicador de la producción de óxido nítrico. Basados en esto, podemos señalar que los niños que presentan este tipo de condición patológica, presentan como acompañante importante, un desequilibrio en el estrés nitrosativo/oxidativo el cual puede condicionar una parte importante del daño metabólico a los tejidos.

CONCLUSIONES.

En los niños que presentan HP secundaria a la presencia de comunicación interventricular, se observa que existe una alteración importante en su balance oxidativo originado por un incremento en la concentración plasmática de MDA junto con una disminución en la concentración del óxido nítrico el cual puede ser un reflejo en la “falla” de producción de este metabolito lo que puede ser una parte del problema fisiopatológico de la presencia de la hipertensión arterial pulmonar.

Esta alteración en las concentraciones de ambos metabolitos reflejan la presencia de un estrés metabólico ya que se refleja como alteraciones en el estatus antioxidante total por lo que se deben más estudios para elucidar el papel de esta condición en la salud de este tipo de pacientes para evitar en lo posible, un mayor daño a su organismo que pueda afectar el resto de su vida en forma permanente.

Cuadro 1. Características generales de los niños del grupo control y los que presentaron hipertensión pulmonar (H.P.). Los datos se presentan como promedios \pm D.E. (rango) para cada grupo, o como porcentajes, según corresponda.

Variable	Control (n= 20)	H. P. (n= 23)
Género (F/M)	12/8	16/7
Edad (años)	3.24 \pm 1.02 (0.4-5)	2.4 \pm 1.51 (0.7-6)
Peso (kg)	16.32 \pm 7.9 (4.5-28)	8.32 \pm 4.21 (4.4-26)
Características clínicas		
Disnea (%)	---	80
Fatiga (%)	---	72
Cianosis con ejercicio (%)	---	30
Sincope (%)	---	7
Hepatomegalia (%)	---	11
Parámetros Hemodinámicos		
PPM (mmHg)	< 25*	59.6 \pm 18.2
Índice cardiaco (L/min/m ²)	2.5 a 3.5*	3.1 \pm 1.3
IRVP (Unidades Wood m ²)	1.1 a 1.6*	7.6 \pm 4.3

* valor normal tomado como referencia de la literatura.

PPM: presión pulmonar media; IRVP: índice de resistencia vascular pulmonar.

Figura 1.

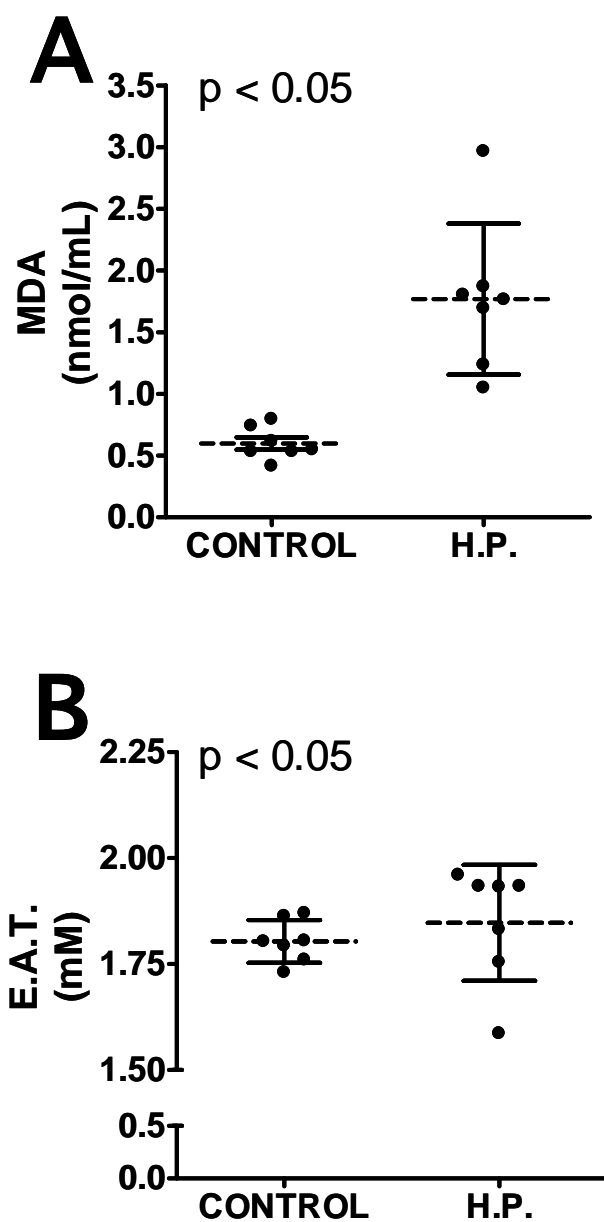


Figura 1. Distribución de la concentración de MDA (A) y el estatus antioxidante total (EAT; panel B) en cada uno de los sujetos del grupo control y con hipertensión pulmonar (H.P.). La línea horizontal discontinua en cada gráfica representa el promedio \pm D.E. de cada grupo correspondiente. Los niveles de MDA y el EAT mostraron diferencias significativas en los pacientes del grupo control comparado con los pacientes del grupo con HP.

Figura 2.

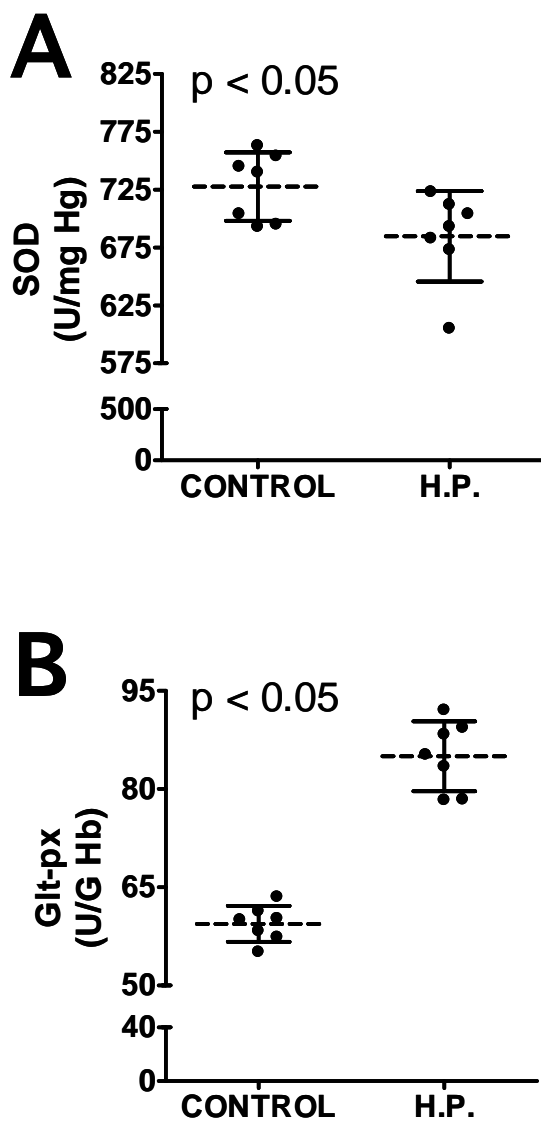


Figura 2. Distribución de la actividad de la enzima SOD (A) y la Glt-px (B) en cada uno de los sujetos del grupo control y con hipertensión pulmonar (H.P.). La línea horizontal discontinua en cada gráfica representa el promedio \pm D.E. de cada grupo correspondiente

Figura 3.

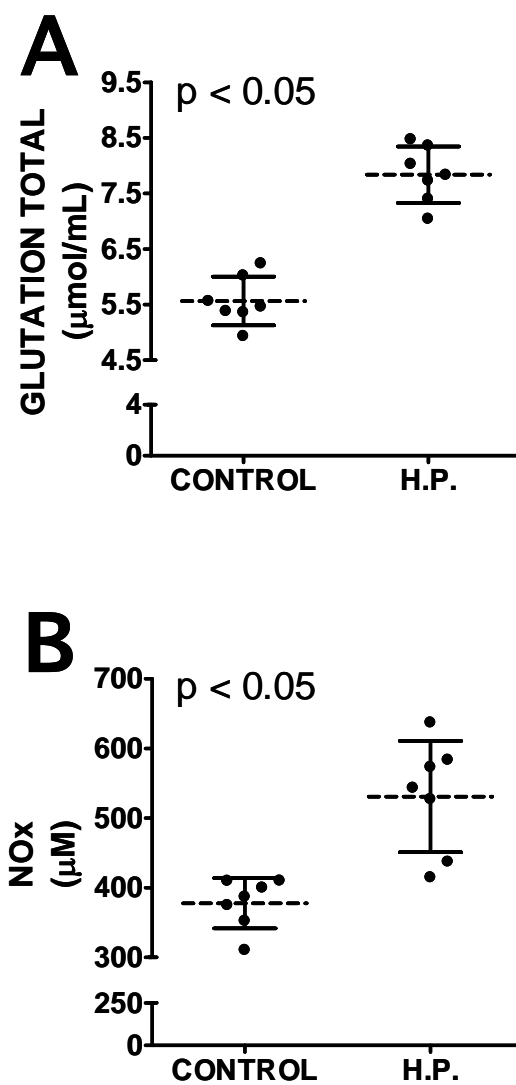


Figura 3. Distribución de la concentración de glutatión total (A) y de NOx (B) en cada uno de los sujetos del grupo control y con hipertensión pulmonar (H.P.).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

26

1. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 8th ed.
2. Rubin L. ACCP consensus statement: primary pulmonary hypertension. *Chest* 1987; 104: 236-250.
3. Haworth S.; Pulmonary Hypertension in Children. New Insight offer opportunity to reverse the disease process. *Advances in Pulmonary Hypertension Summer 2003 Vol 2 N° 2.* pag. 4– 10. (definición de HTP).
4. Berman Rosenzweig E.; Eisenmenger Syndrome in Adults. Strategies to correct Congenital Defects before Fixed Vascular Disease develops. *Advances in Pulmonary Hypertension Summer 2003 Vol 2 N° 2* pag. 13 – 19.
5. Severson C; McGoon M; Continuous Intravenous Epoprostenol for Pulmonary Arterial Hypertension: Highlighting Practical Issues, Special considerations. *Advances in Pulmonary Hypertension Winter 2002 Vol 1 N° 3:* pag. 4-8.
6. Mc Laughlin V.; Oral and subcutaneous Prostacyclin analogs: Analyzing the latest evidence on efficacy and Safety. *Advances in Pulmonary Hypertension Winter 2002 Vol 1 N° 3:* pag. 11- 15.
7. Olschewski O.; Inhaled Iloprost for Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Advances in Pulmonary Hypertension Winter 2002 Vol 1 N° 3:* pag. 16-21.
8. Barst R.; Task force on Diagnosis and Assessment; Identifying the most Useful Tools . *Advances in Pulmonary Hypertension Autumn 2003 Vol 2 N° 3.* pag. 13-14.
9. Oudiz R.; Cardiac Catheterization in Pulmonary Arterial Hypertension: A Guide to Proper Use. *Advances in Pulmonary Hypertension Autumn 2002 Vol 1 N° 2* pag. 10-16.
10. Criterios de respuesta vasodilatador. Sandoval J.; *Circulation* 1994; 89: 1733 – 1744
11. D'Alonzo GE.; Barst RG.; Ayres SM. Et al.; Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 1991; 115:343-9 (curva de Sobrevivencia de PADm).
12. Raffy O.; Asarian R.; Brenot F. Et al.; Clinical Significance of the Pulmonary Vasodilator Response during Short Term Infusion of Prostacyclin in Primary Pulmonary Hypertension. *Circulation* 1996;93:484-8. (pronóstico del Test en la sobrevivencia)
13. Wilkinson J.; Haemodynamic Calculations in the Catheter Laboratory. *Heart* 2001;85:113-120.
14. Sandoval J.; Síndrome de Eisenmenger. *Avances en la Patobiología y Tratamiento. Archivos de Cardiología de México.* Vol 72 Supl. 1 Ene-Mar Pag. 207-211.
15. Rubin L.; Diagnosis and Management of Pulmonary Arterial Hypertension: ACCP Evidence –based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2004; 126: 7-10.
16. Mc Crory D.; Methodology and Grading for Pulmonary Hypertension Evidence Review and Guideline development. *Chest* 2004; 126: 11-13.
17. Doyle R.; Surgical Treatments/Interventions for Pulmonary Arterial Hypertension. ACCP Evidence-Based clinical practice guidelines. *Chest* 2004; 126: 63 – 71
18. Simmonneau G.; Continuous Subcutaneous Infusion of treprostinil a Prostacyclin analogue, In Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *Amer Jour Resp Crit Care Med* Vol 165:6 March 15 2002: pp 800-804.
19. Santos S.; Peinado V.; Conceptos actuales sobre la patogenia de la Hipertensión Pulmonar. *Arch Bronconeumol* 2002; 38 (supl.1):10-5.
20. Lobo J.; Pauta de tratamiento de la Hipertensión Pulmonar. *Arch Bronconeumol* 2002; 38 (supl 1):24-8.
21. Gómez Sánchez M.; et al.; Nuevos tratamientos Médicos. *Arch Bronconeumol* 2002; 38 (supl 1):29-32.

22. Ussetti P. et al.; Alternativas Quirúrgicas en el Tratamiento de la Hipertensión Pulmonar grave. Arch Bronconeumol 2002;38 (supl 1):33-8.
23. Hernández C.; Fármacos y Sistemas de administración empleados en el Tratamiento de la Hipertensión Pulmonar. Arch Bronconeumol 2002; 38 (supl 1): 39-47.
24. Morales P.; Trasplante Pulmonar : Opción Terapéutica final en la Hipertensión Pulmonar. Avances en Hipertensión Pulmonar: Doyma Up-Date N° 3 May 2004 pag. 1-5.
25. Voelkel N.; Severe Angioproliferative Pulmonary Hypertension: The Lung Circulation between Vasoconstriction and Cancer. Advances in Pulmonary Hypertension Winter 2003 Vol. 2 N° 4. pag. 4-8.
26. Channik R.; Endothelin Receptor Antagonism: A new Era in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. Advances in Pulmonary Hypertension Spring 2002 Vol 1, N° 1. pag. 12-16.
27. Cantu III, E.; Lung Transplantation: Timing, Perioperative Considerations and Post operative Outcome. Advances in Pulmonary Hypertension Spring 2004: Vol 3 N° 1. pag. 9 – 17.
28. Weitzenblum E.; Chronic Cor Pulmonale Heart 2003;89;225-230.
29. Libro de resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Cardiología Intervencionista: Trabajo Libre N° 197: Oclusión Temporal de Ductus Arterioso Persistente en pacientes de altura con Hipertensión Pulmonar Severa ¿Opción quirúrgica aún – pag 152 - SOLACI 1999. Santiago – CHILE.
30. Hipertensión Arterial Pulmonar – Meditex 2002. Documento de consenso de la Sociedad Española de Cardiología y la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Octubre 2001
31. Barbera J. Importancia de la Hipertensión Pulmonar asociada a otras Enfermedades. Avances en Hipertensión Pulmonar Doyma UpDate N° 2 Feb 2004.
32. Rich et al. The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary Hypertension. N Engl J Med 1992;327: 76-81.
33. Badesh et al. Medical Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension ACCP Evidence based clinical Practice Guidelines Chest j 126:1:July 2004 Supplement 35S-61S.
34. Cánova J. Diagnostico de la Hipertensión Pulmonar Primaria Archivos de Bronconeumología – Doyma Vol, 38, Suplemento 1, 2002.
35. Gutiérrez Salinas J, Morales González JA. Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. Med Int Mex 2004;20(4):287-95.
36. Gutiérrez-Salinas J, Zentella de Piña M, Piña E. Acute ethanol intake produces lipid peroxidation in rat red blood cells membranes. Biochem Mol Biol Int 1993;29(2):263-70.
37. Gutiérrez-Salinas J. Función de los complementos antioxidantes durante el ejercicio Med Int Mex 2007;23:217-22.
38. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev 1994;74(1):139-62.
39. Dekkers JC, van Doornen LJ, Kemper HC. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. Sports Med 1996;21(3):213-38.
40. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role antioxidant nutrients. FASEB J 1987;1(6):441-5.
41. Halliwell B., Gutteridge J.M., Cross C.E. Free radicals. Antioxidants and human disease. Where and we now. J Lab Clin Med, 1992;119:598-620.
42. Tappe A.L. Lipid peroxidation damage to cell components. Fed Proceedings, 1973;32:1870-1874.
43. Fridovich I. Superoxide radical: An endogenous toxin. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1983;23:239-257.
44. Gutiérrez-Salinas J. ¿Que sabe acerca de Radicales libres?. Rev Mex Cien Farm, 2006;37:69-73.

45. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-6.
46. Förstermann U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem*. 2006;387(12):1521-33.
47. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem Soc Trans*. 1989;17:642-4.
48. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999;43:562-71.
49. Van der Zee J, Van Steveninck J, Koster JF, Dubbelman TMAR. Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by t butylhydroperoxide-derived radicals. *Biochim Biophys Acta* 1989;980:175-180.
50. Dodge JT, Mitchell C. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963;100:119-130.
51. Gutiérrez-Salinas J, Zentella de Piña M, Piña E. Acute ethanol intake produces lipid peroxidation in rat red blood cells membranes. *Biochem Mol Biol Inter* 1993;29:263-270.
52. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;1:265-275.
53. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.
54. Aebi ABH. Catalasa activity. En: Bergmeyer H.U. Bergmeyer J. Grabl M. (eds) *Methods in Enzymatic Analysis* Verlag Chemie Florida 1983 vol. 3 pp. 273-282.
55. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-6055.
56. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-169.
57. Cortas N.K., Wakid N.W. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. *Clinical Chemistry*, 1990;38:1440-1443.
58. Wolz M., McAllister R.J., Davis D., Feelisch M., Moncada S. Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin. Mechanisms underlying synthesis, NO release and biological activity. *J Biol Chem*, 1999;274:28983-28990.
59. *Rev Mex Patol Clin* 2008;55:21-28.
60. Cortas N.K, Wakid N.W. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990, 38:1440-1443.
61. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.
62. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;95:351-358.
63. Sethi S, Pratap MS, Dikshit M. Nitric oxide-mediated augmentation of polymorphonuclear free radical generation after hypoxia-reoxygenation. *Blood* 1999;93:333-340.
64. Yoshida K, Kasama K. Biotransformation of nitric oxide. *Environmental Health Pers* 1987;73:201-206.
65. Toda N, Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Parmacol Rev* 2003;55:271-324.
66. Rubbo H, Tarpey M, Freeman BA. Nitric oxide and reactive oxygen species in vascular injury. *Biochem Soc Symp* 2000;61:33-35.

67. Rathaus M, Bernheim J. Oxygen species in the microvascular environment: regulation of vascular tone and the development of hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:216-221.
68. Aiko O, Vuopala K, Pokela ML, Hallman M. Diminished inducible nitric oxidase synthase expression in fulminant

- early-onset neonatal pneumonia. *Pediatrics* 2000;105:1013-1019.
69. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994;343:1199-12-06.
70. Petros A, Bennet D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991;338:1557-1558.

ANEXO

Artículo enviado para su publicación a la Revista Medicina Interna de México. Se anexa artículo enviado.

DETECCIÓN DE ESTRÉS NITROSANTE EN NIÑOS CON HIPERTENSION PULMONAR SECUNDARIA A COMUNICACIÓN INTERVENTRICULAR.

Fausto César García Hernández^{*}, José Gutiérrez Salinas^{**}, Liliana García Ortiz^{***}, Sotero Ramírez García^{****}, Norma Rebeca Núñez Ramos^{****}, Sergio Hernández Rodríguez^{**}, Hazel Carranza Castro¹, Abel Archundia García².

*Cirugía Cardio-Torácica, Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE, México DF.

**Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE, México DF.

***División de Medicina Genómica, Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE, México DF.

****Uromédica OSF, México DF.

¹Servicio de Cirugía Experimental, Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE, México DF.

²División de Investigación Clínica y Cirugía, Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE, México DF.

Correspondencia:

Dr. José Gutiérrez Salinas,

Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental,

División de Investigación Biomédica,

Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE.

San. Lorenzo No. 502, 2º piso, Col. Del Valle, C.P. 03100, México, D.F.

Tel: 5200-5003, ext. 86881

E-mail: quauhtlicutli@yahoo.com

RESUMEN.

Introducción: La hipertensión pulmonar (HP) en niños, secundaria a comunicación interventricular es una situación que produce alteraciones generales en el organismo caracterizadas por reactividad importante en el sistema vascular cardio-pulmonar. En modelos experimentales se ha comprobado que existe estrés nitrosante que acompaña a la HP, por lo que el objetivo del presente trabajo es detectar la presencia de éste tipo de condiciones metabólicas en niños que presentan esta patología.

Material y Métodos: A niños (0 a 5 años) que tienen diagnóstico clínico de HP secundario a comunicación interventricular, se les tomó una muestra de sangre para aislar el plasma en donde se determinó por métodos espectrofotométricos usando kits comerciales, la concentración de malondialdehído (MDA), nitratos totales (NOx) y el estatus antioxidante total (EAT). Como grupo control, se tomaron muestras de sangre en niños sin patología cardiovascular, pareados en edad al grupo en estudio. **Resultados:** La concentración de MDA en los niños con HP presenta un incremento estadísticamente significativo de 2.55 veces respecto al grupo control ($p < 0.05$), al igual que el EAT que presenta un incremento del 14%. Por otro lado, la concentración de NOx es 1.42 veces menor en los pacientes con HP en comparación con el grupo control.

Conclusiones: Nuestros resultados muestran que los niños con HP presentan alteraciones en su balance nitrosativo, indicativos de la presencia de un estrés nitrosativo secundario a su patología de base que puede alterar el resto del organismo, principalmente al sistema circulatorio.

Palabras clave: malondialdehído, hipertensión pulmonar, nitratos totales, cardiopatía

ABSTRACT:

Background: Pulmonary hypertension (PH) in children secondary to ventricular septal defect is a condition that causes changes in the organism, characterized by hyperactivity in the cardiopulmonary system. In experimental models it was found that there nitrosative stress accompanying the PH. The aim of this study is to detect this type of metabolic conditions in children with this disease.

Material and Methods: A sample of blood from childrens (0-5 years old) with the diagnosis of PH secondary to septal defect was used. With use of spectrophotometric methods, we determine the concentration of malondialdehyde (MDA), total nitrates (NOx) and total antioxidant status (TAS). As a control group, children without cardiovascular disease were sampled age-matched to the group under study.

Results: The concentration of MDA in children with PH presents statistically significant increase, 2.55 times compared to the control group ($p < 0.05$), as did the TAS with increase of 14%. Moreover, the NOx concentration is 1.42 times lower in patients with PH compared to control group.

Conclusions: We conclude that children with HP manifest alterations in nitrosative balance, indicative of nitrosative stress secondary to the underlying pathology that can alter the rest of the organism, especially the circulatory system.

Key words: malondialdehyde, pulmonar hipertensión, total nitrates, cardiac disease.

INTRODUCCIÓN.

La Hipertensión Pulmonar (HP) es una enfermedad que se caracteriza por la elevación de la presión arterial pulmonar media (PAPm) por encima de 25 mmHg durante el reposo o elevación por encima de 30 mmHg. durante el ejercicio, siendo el valor normal de 15 mmHg en reposo.^{1,2} Existen varios tipos generales de HP que son aislada o asociada a enfermedad subyacente.

La etiología de la HP se basa en la clasificación más reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que incluye 5 categorías: 1) hipertensión pulmonar arterial (HPA), 2) Hipertensión pulmonar (HP) asociada con enfermedad cardíaca izquierda, 3) HP asociada con enfermedad pulmonar y/o hipoxemia, 4) HP asociada con enfermedad tromboembólica crónica y 5) HP asociada con otros desordenes en donde se incluye a la HPA idiopática, familiar, asociada con enfermedad de la colágena, cortos sistémico-pulmonares congénitos, hipertensión portal, HIV, drogas/toxinas y otras condiciones tales como telangiectasia hemorrágica hereditaria (Síndrome Osler-Weber-Rendu) y hemoglobinopatías.¹⁻⁶

La característica fisiopatológica de la HP es el desarrollo del incremento de la resistencia vascular pulmonar que conduce a incremento de la postcarga del ventrículo derecho con progresión a falla cardíaca derecha y muerte sin tratamiento.¹⁻⁶

Los síntomas más frecuentes son disnea de esfuerzo, angina, síncope o presíncope, astenia y fenómeno de Raynaud. Los signos más frecuentes son: segundo ruido reforzado en foco pulmonar, galope ventricular derecho por cuarto tono, frémito palpable en borde esternal izquierdo (hipertrofia ventricular derecha), pulso venoso con onda "a", pulso venoso con onda "v", presión venosa yugular elevada, soplo de Graham-Steell, signos de insuficiencia cardíaca derecha y galope ventricular derecho por tercer tono.⁴⁻⁶

Las cardiopatías congénitas en niños son las principales causas del desarrollo de HP siendo la presencia de comunicación interventricular la más frecuentemente reportada a nivel mundial⁷ por lo que puede representar un alto gasto de recursos puesto que las personas afectadas con este tipo de patologías requieren de cuidados a lo largo de su vida y aún cuando su patología cardíaca puede ser resuelta quirúrgicamente, su condición general puede verse alterada en forma permanente.^{7,8}

En relación con lo anterior, estudios realizados en modelos experimentales con animales, han demostrado que la presencia de HP puede provocar un efecto a largo plazo en donde se

altera la circulación general y que no es revertida a pesar de eliminar la causa que provocó el desarrollo de la HP.^{9,10} Se ha pensado que la producción de radicales libres, principalmente el óxido nítrico y los derivados del oxígeno, pueden tener un papel fundamental en el desarrollo de daño general pero principalmente vascular a nivel arterial ya que las células epiteliales de los vasos sanguíneos producen en forma regular, óxido nítrico el cual es un conocido regulador metabólico y fisiológico, que tiene un papel fundamental en el mantenimiento del tono arterial general y local.¹¹⁻¹³

Es conocido el hecho de que el endotelio de las arterias produce en forma constante óxido nítrico el cual, como se menciona, tiene un papel fundamental en la regulación del tono vascular por lo que, cualquier alteración en su producción, puede tener consecuencias en la circulación general y local ya que la contracción o relajación del músculo liso del endotelio, es altamente sensible a los niveles de óxido nítrico.¹¹⁻¹³ Por otro lado, estudios hechos con modelos in vitro han señalado que la producción de óxido nítrico induce en forma directa y/o indirecta la formación de radicales libres derivados del oxígeno los cuales interactúan con las macromoléculas de las células y alteran tanto su estructura como su función.¹¹⁻¹⁶ Además, si en determinado momento existe un desbalance entre la cantidad de radicales libres ya sea derivados del oxígeno o del nitrógeno (como es el caso del óxido nítrico); y la cantidad de antioxidantes en el organismo, se produce una condición conocida como estrés oxidativo y/o nitrosativo que puede alterar en forma provisional o permanente tanto la estructura como la función de la célula y el organismo en general.¹¹⁻¹⁶

En el laboratorio se puede determinar la presencia de un estrés ya sea oxidativo y/o nitrosativo haciendo la determinación de metabolitos que se relacionan directamente con el tipo de radicales que afectan a las macromoléculas además de que se puede determinar el llamado estatus antioxidante total el cual constituye una medida de la concentración de oxidantes/antioxidantes que existen en un momento dado ya sea en la célula o el organismo.¹⁴⁻¹⁶ De esta forma, la determinación de la concentración de nitratos totales es una medida de la presencia del óxido nítrico y la determinación de malondialdehído es un parámetro aceptado de la presencia de daño por radicales libres derivados del oxígeno y por tanto, de la presencia de un estrés oxidativo; a su vez, tal como se menciona con anterioridad, la determinación del estatus antioxidante total es un reflejo general del balance que existe entre los sistemas oxidantes/antioxidantes del organismo.¹¹⁻¹⁸

Experimentos hechos con animales de laboratorio han demostrado que existe un estrés metabólico caracterizado por una alteración en el balance de los radicales libres los cuales pueden ser un componente importante en el proceso fisiopatológico de daño general al organismo. Este tipo de estudios también indican que el grado de daño por el estrés metabólico depende del tiempo y grado de hipertensión por lo que se han propuesto que la determinación de los metabolitos derivados del daño provocado por las especies reactivas derivadas del oxígeno y/o el nitrógeno, pueden ser indicadores del daño y servir como factores pronósticos en este tipo de patologías. Por todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo es determinar la concentración de nitratos totales, malondialdehído y el estatus antioxidante total en niños que presentan hipertensión arterial pulmonar secundario a la presencia de comunicación interventricular, en un intento de entender los procesos fisiopatológicos de daño provocado por las alteraciones entre los elementos antioxidantes y los oxidantes que presenta el organismo.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Selección de la población en estudio.

Se seleccionaron niños de ambos sexos de edades diversas (meses de nacimiento y hasta 5 años) que son presentados al servicio de cardiología de nuestra institución que son referidos por presentar el diagnóstico de presencia de comunicación interventricular con el desarrollo de hipertensión pulmonar arterial. A cada paciente, bajo consentimiento informado y permiso de sus padres, se le realizó una historia clínica y se le realizaron estudios rutinarios de laboratorio y gabinete además de solicitarles un estudio con ecoardiografía Doppler para evaluar su condición cardio-pulmonar. Como grupo control se tomaron muestras de sangre de niños aparentemente sanos sin ningún problema cardio-pulmonar, pareados en edad y sexo con el grupo que presenta HP.

Toma de muestras de sangre y su procesamiento.

Muestras de sangre fueron tomadas en cada uno de los sujetos del grupo control y el que presenta HP. Las muestras se tomaron por venopunción en ayuno de 12 horas. Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos con anticoagulante (heparina ó EDTA) y centrifugadas a 1500 rpm por 15 min para obtener el plasma el cual fue colocado en viales y congelado a -70 °C hasta su posterior uso tal como ha sido descrito previamente.¹⁹

Determinación de la concentración de nitratos totales.

Como reflejo de la concentración de óxido nítrico en plasma, se determinó la concentración de nitratos totales (NOx) en muestras de plasma usando un kit de reactivos comerciales (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) basada en el procedimiento propuesto por Cortas y Wakid²⁰ usando cadmio activado para derivar los nitritos del plasma. Brevemente se prosiguió como sigue: un volumen de plasma fue filtrado a través de un filtro de 0.22 μ m (Millex-GV, PVDF-durapore, Millipore Co, Bedford M.A. U.S.A.) El filtrado fue desproteinizado agregando cuatro volúmenes de solución de sulfato de zinc (75 mM) e hidróxido de sodio (55 mM) agitando brevemente y centrifugando a 5000 rpm por 10 minutos para recuperar el sobrenadante. Un volumen del sobrenadante fue usado para su derivación con gránulos activados de cadmio siguiendo el procedimiento de Cortas y Wakid.⁷ Obtenido el derivado de nitratos, se toma un volumen y se mezcla con 2.5

volumenes de agua bidestilada, un volumen de sulfanilamida (3% p/v en HCl 0.4N) y de N-naptiletilendiamina (0.1% p/v en agua bidestilada). La mezcla se agita brevemente y se deja incubar 30 minutos al termino de los cuales, se lee a 540 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6300, Cielovista, Cal. USA). La concentración de nitratos totales se reporta en nmol/L de acuerdo con una curva patrón hecha con concentraciones variables de KNO_3 .^{19,20}

Determinación de malondialdehído.

La concentración de malondialdehído (MDA) como un índice de lipoperoxidación en las muestras de plasmas de ambos grupos en estudio fue mediante el uso de un kit de reactivos comerciales (MyBiosource, Cal, USA) basado en el método descrito por Ohkawa.²¹ Brevemente se procedió de la siguiente manera: En un tubo de ensayo se colocaron 200 mL de suero junto con 1.5 mL de ácido acético (20%) y 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico (0.8% en agua). Se mezcla a homogeneidad y se coloca en agua a ebullición por 60 minutos al término de los cuales se agregó 1 mL de agua bidestilada y 5 mL de butanol/piridina (15:1 v/v) agitándose vigorosamente. La muestra fue centrifugada por 10 minutos a 2500 rpm recuperándose el sobrenadante el cual fue leído a 545 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6300, Cielovista Cal. USA) calculando la concentración de MDA a partir del coeficiente de extinción ($1.54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y expresando la concentración en nmol/mg proteína total.

Determinación del estatus antioxidante total.

El estatus antioxidante total (EAT) fue determinado en muestras de plasma (20 μL) usando el kit de reactivos de Calbiochem (Calbiochem; Cat. No. 615700) que esta basado en la capacidad que tiene la muestra de inhibir la oxidación del ABTS (2,2'-azido-di-(3-etilbenzen-thiazolidina sulfonato) haciendo la lectura a 600 nm en un espectrofotómetro (Jaenway 6300, Cielovista Cal. USA) y expresando el resultado en concentración mili molar.

Determinación de la concentración de proteína.

En todos los casos, la concentración de proteína fue determinada usando el método descrito por Lowry²² usando albúmina de suero bovino como estándar.

Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados usando como base una hoja de cálculo del programa Excel (Microsoft Corporation, USA) y el programa estadístico GraphPad Prism V-4.00 (GraphPad Software, San Diego, Cal., U.S.A.). Los resultados cualitativos fueron analizados usando tablas de contingencia y prueba de Yates. Los datos cuantitativos fueron analizados por “t” de student no pareada y la asociación entre variables por medio del coeficiente de Spearman. Para todos los casos, se tomo en cuenta una $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS.

El Cuadro 1 muestra las características generales de los niños con HP y los del grupo control. Como puede observarse, los niños que presentan HP tienen alteraciones vasculares compatibles con la presencia de HP, que es secundario a la presencia de comunicación interventricular que es su patología de base. Como se muestra en dicha tabla, los síntomas y signos de predominio cardio-pulmonar se encuentran presentes en diversas proporciones entre los niños con el padecimiento de base y que desarrollaron HP.

Por otro lado, la Figura 1 muestra las concentraciones de nitratos totales (NOx) en ambos grupos en estudio. Se considera a la determinación de NOx como un indicador directo de la producción de óxido nítrico en el organismo (biblio) por lo que, de acuerdo con lo que se muestra en la Figura 1, los niños que presenta HP presentan una disminución en la concentración plasmática de NOx estadísticamente significativa del 31.57% en comparación con el grupo control (376.5 ± 39.19 nmol/L vs 257.62 ± 22.48 nmol/L; $p < 0.05$, respectivamente), lo que se interpreta como una menor producción de óxido nítrico en los niños que presentan esta patología.

Por otro lado, en la Figura 2 se muestra el promedio de las concentraciones de MDA tanto en el grupo control como en el que tiene HP. La determinación de la concentración de este metabolito es considerada un buen índice de daño a los lípidos poliinsaturados por acción directa de los radicales libres derivados del oxígeno, por lo que podemos observar que dicho daño es mayor en los pacientes con HP ya que presentan un incremento de hasta 2.39 veces con respecto al grupo control (0.59 ± 0.11 nmol/mg prot vs 1.41 ± 0.27 nmol/mg prot; $p < 0.05$, respectivamente), indicando un gran daño al organismo.

Además, la Figura 3 muestra la determinación del estatus antioxidante total realizada en las muestras obtenidas del grupo control y los que presentaron HP. En este caso, se observa que existe un incremento en el estatus antioxidante total del 15.03% en el grupo con HP en relación con el grupo control (2.074 ± 0.062 mM vs 1.803 ± 0.051 ; $p < 0.05$, respectivamente).

Por otro lado, puesto que el estatus antioxidante total muestra la condición del balance oxidativo dependiendo del equilibrio entre los oxidantes y antioxidantes que se producen en el organismo en un momento determinado, se ha empleado la asociación o relación de este estatus total con la concentración de metabolitos que potencialmente son oxidativos o

dañinos para el organismo. De esta forma, la Figura 4 muestra la correlación entre el estatus antioxidante total y las concentraciones de nitratos totales y MDA tanto en los niños del grupo control como los que presentan HP. Como se puede observar, los niños del grupo control muestran una asociación positiva entre el estatus antioxidante total y las concentraciones de MDA y de nitratos totales ($r= 0.31$ y $r= 0.32$; para ambos $p< 0.05$; respectivamente) (Figura 4 A y B; respectivamente). Por el contrario, los niños que presentan HP muestran una asociación negativa ($r= -0.59$; $p< 0.05$) entre el estatus antioxidante total y la concentración de nitratos totales así como una asociación positiva ($r= 0.47$; $p< 0.05$) entre el estatus antioxidante total y la concentración de MDA (Figura 4, C y D; respectivamente).

DISCUSIÓN.

Nuestros resultados muestran que existe una alteración importante en el balance oxidativo en los niños que presentan hipertensión arterial pulmonar secundaria a la presencia de comunicación interventricular. Esta alteración en el balance se debe principalmente a la presencia de un exceso en la concentración de MDA así como una marcada disminución en la concentración de nitratos totales y que, ambos, están en asociación directa con el estatus antioxidante total.

Se ha considerado que la determinación de la concentración de nitratos totales es una medida de la presencia de óxido nítrico el cual es producido por las células endoteliales del sistema vascular arterial y que tiene un conocido efecto vasodilatador además de otras funciones metabólicas por ser también reconocido como una molécula de señalización intracelular.¹¹⁻¹⁵ Es por ello que su concentración en el organismo debe ser regulada en forma muy precisa para evitar alteraciones metabólicas y fisiológicas generales que induzcan un cambio importante del tono vascular que origine ya sea un proceso de hipertensión o de hipotensión generalizada ya sea por la falta o el exceso (respectivamente) del óxido nítrico. En modelos experimentales se ha descrito que situaciones en las cuales se produce un exceso en la producción de óxido nítrico origina una vasodilatación mientras que, una disminución en la producción de este metabolito produce una vasoconstricción; ambas situaciones están asociados a proceso de hipoxia-reperfusión que afecta a los tejidos en general.^{11,12,14,23-26}

Ha sido descrito que la presencia de un proceso de hipoxia-reperfusión en los tejidos origina diversas clases de alteraciones metabólicas, principalmente las relacionadas con la producción de radicales libres derivados del oxígeno y los derivados del nitrógeno (principalmente óxido nítrico).^{11-14,23-26} De esta forma, se ha descrito en modelos experimentales que patologías cardíacas y/o pulmonares que originan una condición de hipoxia-reperfusión en forma continua, producen alteraciones en el balance oxidativo y en las concentraciones de los principales metabolitos indicadores de daño oxidativo como son el MDA y los nitratos totales.²³⁻²⁸ Así, se ha descrito en este tipo de modelos que, durante la fase de hipoxia tisular, se produce un incremento importante en la producción de nitratos totales (y por tanto, de nitrógeno) y en la fase de perfusión existe un incremento

importante de MDA (es decir, de radicales libres derivados del oxígeno) lo que indica un daño oxidativo al organismo.²³⁻²⁸

Contrario a lo descrito anteriormente con modelos animales, nuestros resultados muestran que en los niños con cardiopatía que origina una hipertensión arterial pulmonar, presentan una importante disminución en la concentración de nitratos totales, que se interpreta como una disminución en la concentración de óxido nítrico. Pensamos que este hecho puede ser originado por una disminución importante en la expresión vascular de la enzima óxido nítrico sintetasa (principal enzima encargada de la síntesis del óxido nítrico) causada por la patología cardio-pulmonar de base que presentan este tipo de pacientes. Lo anterior está apoyado por la observación de que procesos patológicos agudos o crónicos fatales pueden originar una disminución en la expresión de esta enzima con la consiguiente disminución en la producción de óxido nítrico y con ello aumentar el tono vascular general y/o local.²⁸⁻³⁰

Por otro lado, se ha reportado que cuando el balance nitrosativo (producción de óxido nítrico) se ve alterado, se produce un exceso en la producción de radicales libres derivados del oxígeno los cuales pueden incrementar el daño general al organismo.^{11,13,14,16,18,26,27}

Podemos hipotetizar que el defecto que consiste en la presencia de comunicación interventricular origina como proceso secundario una hipertensión arterial pulmonar permanente que no puede ser compensada por los sistemas antioxidantes del organismo puesto que encontramos una correlación inversa entre el estatus antioxidante total y las concentraciones de MDA y nitratos totales siendo el primer metabolito un indicador importante de daño general al organismo por la presencia de radicales libres derivados del oxígeno y, en el caso de los nitratos totales, son considerados como un indicador de la producción de óxido nítrico y, de acuerdo con nuestros resultados, podemos afirmar que dicho metabolito se encuentra muy disminuido en este tipo de pacientes. Puesto que una disminución en la producción de óxido nítrico produce un incremento en la tensión arterial general, pensamos que en este tipo de pacientes, en donde existe un defecto cardíaco anatómico permanente lo que origina un daño oxidativo (evidenciado por el incremento en la concentración de MDA), así como un daño nitrosativo (evidenciado por la disminución en la concentración de nitratos totales), lo que genera un desbalance general en el estatus antioxidante total del organismo por lo que podemos señalar que los niños que presentan este tipo de condición patológica, presentan como acompañante importante, un estrés

nitrosativo/oxidativo el cual puede condicionar una parte importante del daño metabólico a los tejidos.

CONCLUSIONES.

En los niños que presentan HP secundaria a la presencia de comunicación interventricular, se observa que existe una alteración importante en su balance oxidativo originado por un incremento en la concentración plasmática de MDA junto con una disminución en la concentración del óxido nítrico el cual puede ser un reflejo en la “falla” de producción de este metabolito lo que puede ser una parte del problema fisiopatológico de la presencia de la hipertensión arterial pulmonar.

Esta alteración en las concentraciones de ambos metabolitos reflejan la presencia de un estrés metabólico ya que se refleja como alteraciones en el estatus antioxidante total por lo que se deben más estudios para elucidar el papel de esta condición en la salud de este tipo de pacientes para evitar en lo posible, un mayor daño a su organismo que pueda afectar el resto de su vida en forma permanente.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Rubin L. Diagnosis and Management of Pulmonary Arterial Hypertension: ACCP Evidence-based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2004;126:7-10.
2. Hipertensión Arterial Pulmonar. Meditex 2002. Documento de consenso de la Sociedad Española de Cardiología y la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Octubre 2001.
3. Simmonneau G. Continuous Subcutaneous Infusion of treprostinil a Prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension. *Amer J Resp Crit Care Med* 2002;165:800-804.
4. Santos S. Peinado V. Conceptos actuales sobre la patogenia de la Hipertensión Pulmonar. *Arch Bronconeumol* 2002;38(supl 1):10-15.
5. Lobo J. Pauta de tratamiento de la Hipertensión Pulmonar. *Arch Bronconeumol* 2002;38(supl 1):24-28.
6. Severson C, McGoon M. Continuous Intravenous Epoprotenol for Pulmonary Arterial Hypertension: Highlighting Practical Issues, Special considerations. *Advances in Pulmonary Hypertension Winter* 2002;1(3):4-8.
7. Park MH. Advances in diagnosis and treatment in patients with pulmonary arterial hipertensión. *Catheter Cardivasc Interv* 2008;71:205-213.
8. Chin KM, Rubin LJ. Pulmonar artery hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1527-1538.
9. DeMarco VG, Habibi J, Whaley-Connell AT, Schneider RI. Oxidative stress contributes to pulmonary hypertension in the transgenic (mRen2)27 rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H2659-2668.
10. Ferrari R, Cargnoni A, Curello S, Boffa GM, Ceconi C. Effects of iloprost (ZK 36374) on glutathione status during ischaemia and reperfusion of rabbit isolated hearts. *Br J Pharmacol* 1989;98:678-684.
11. Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 2002;53(4):503-514.
12. Stankevicius E, Kévelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina* 2003;39(4):333-341.
13. May JM, Zhi-Chao Q, Xia L, Cobb CE. Nitric uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C1946-C1954.
14. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52:601-623.
15. Noble DR, Williams DLH. Nitrosation products from S-nitrosothiols via

- preliminary nitric oxide formation. *J Chem Soc Perkin Trans* 2002;2:1834-1838.
16. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1999;344:721-724.
 17. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 1997;43:1209-1214.
 18. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 1998;201:1203-1209.
 19. Gutiérrez-Salinas J, Cruz-Tovar L. Determinación de enzimas antioxidantes y malondialdehído en el suero de niños con IgM positiva para citomegalovirus. *Acta Pediatr Mex* 2009;30(2):77-83.
 20. Cortas N.K, Wakid N.W. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990;38:1440-1443.
 21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.
 22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;95:351-358.
 23. Sethi S, Pratap MS, Dikshit M. Nitric oxide-mediated augmentation of polymorphonuclear free radical generation after hypoxia-reoxygenation. *Blood* 1999;93:333-340.
 24. Yoshida K, Kasama K. Biotransformation of nitric oxide. *Environmental Health Pers* 1987;73:201-206.
 25. Toda N, Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol Rev* 2003;55:271-324.
 26. Rubbo H, Tarpey M, Freeman BA. Nitric oxide and reactive oxygen species in vascular injury. *Biochem Soc Symp* 2000;61:33-35.
 27. Rathaus M, Bernheim J. Oxygen species in the microvascular environment: regulation of vascular tone and the development of hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:216-221.
 28. Aiko O, Vuopala K, Pokela ML, Hallman M. Diminished inducible nitric oxidase synthase expression in fulminant early-onset neonatal pneumonia. *Pediatrics* 2000;105:1013-1019.
 29. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994;343:1199-1206.
 30. Petros A, Bennet D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991;338:1557-1558.

Cuadro 1. Características generales de los niños del grupo control y los que presentaron hipertensión pulmonar (H.P.). Los datos se presentan como promedios \pm D.E. (rango) para cada grupo, o como porcentajes, según corresponda.

Variable	Control (n= 20)	H. P. (n= 23)
Género (F/M)	12/8	16/7
Edad (años)	3.24 \pm 1.02 (0.4-5)	2.4 \pm 1.51 (0.7-6)
Peso (kg)	16.32 \pm 7.9 (4.5-28)	8.32 \pm 4.21 (4.4-26)
Características clínicas		
Disnea (%)	---	80
Fatiga (%)	---	72
Cianosis con ejercicio (%)	---	30
Síncope (%)	---	7
Hepatomegalia (%)	---	11
Parámetros Hemodinámicos		
PPM (mmHg)	< 25*	59.6 \pm 18.2
Índice cardiaco (L/min/m ²)	2.5 a 3.5*	3.1 \pm 1.3
IRVP (Unidades Wood m ²)	1.1 a 1.6*	7.6 \pm 4.3

* valor normal tomado como referencia de la literatura.

PPM: presión pulmonar media; IRVP: índice de resistencia vascular pulmonar.

PIES DE FIGURAS.

Figura 1. Concentración de nitratos totales (NOx) en el plasma de los niños que presentan hipertensión arterial pulmonar (HP) y los del grupo control. Cada grupo se representa por gráficas de cajas con límites superior e inferior en los extremos. Cada grupo representa el resultado de 20-23 datos individuales. * $p < 0.05$.

Figura 2. Concentración de malondialdehído (MDA) determinado en muestras de plasma de niños que presentan hipertensión pulmonar (HP) y en el grupo control. Cada grupo se representa por gráficas de cajas con límites superior e inferior en los extremos. Cada grupo representa el resultado de 20-23 datos individuales. * $p < 0.05$

Figura 3. Estatus antioxidante total determinado en muestras de plasma de niños que presentan hipertensión pulmonar (HP) y en el grupo control. Cada grupo se representa por gráficas de cajas con límites superior e inferior en los extremos. Cada grupo representa el resultado de 20-23 datos individuales. * $p < 0.05$

Figura 4. Graficas que representan la asociación entre el Estatus Antioxidante Total y la concentración de nitratos totales y la concentración de malondialdehído en el grupo control (A y B) y los que presentaron hipertensión pulmonar (C y D).

Figura 1.

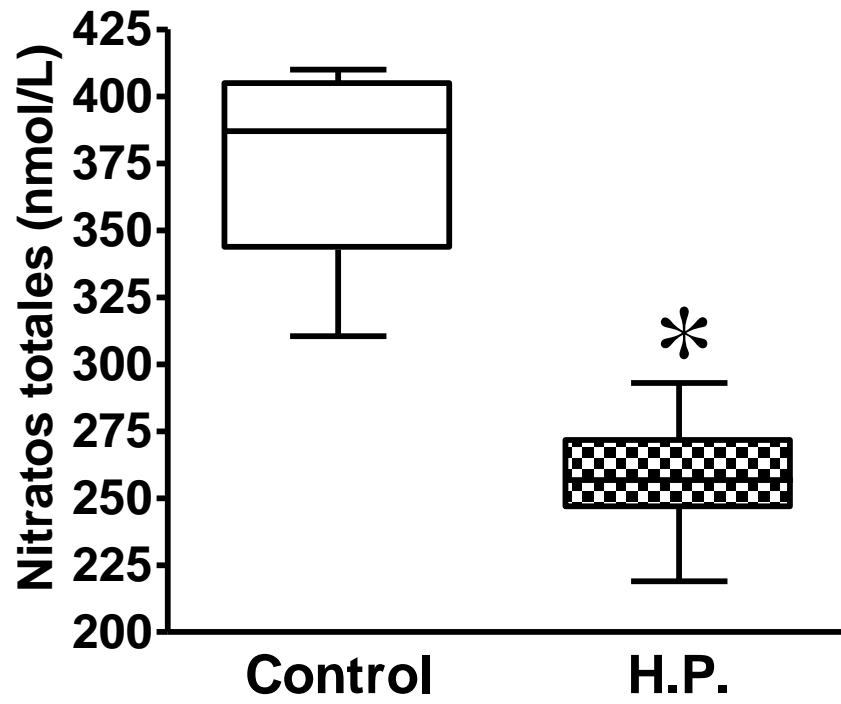


Figura 2.

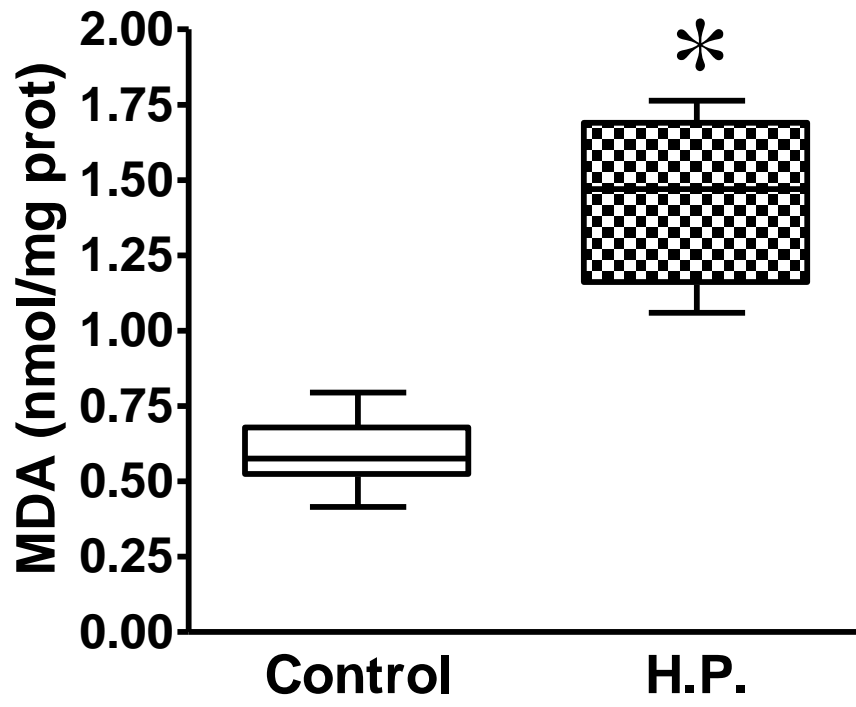


Figura 3.

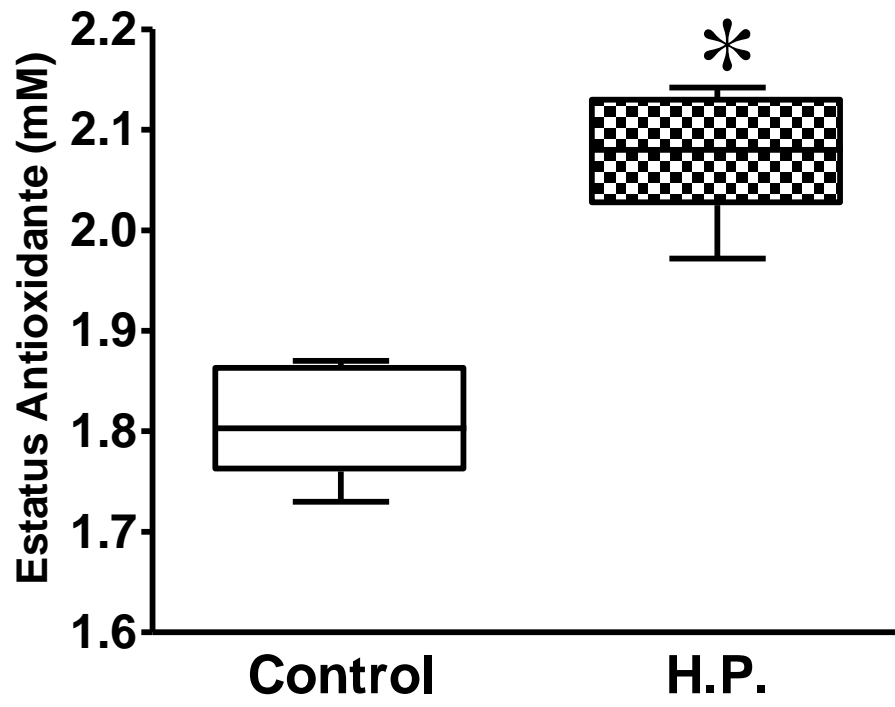


Figura 4.

