

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA



INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA  
"IGNACIO CHAVEZ"



**"PARTICIPACION DE LA SINTASA INDUCIBLE DEL OXIDO NITRICO EN EL ANEURISMA  
AORTICO DE PACIENTES CON SINDROME DE MARFAN"**

Tesis para obtener el título de:

**Especialista en Cirugía Cardiorádica**

Presenta:

Dra. Alejandra Valeria Iturriaga Hernández

Tutores:

Dra. C. M. María Elena Soto López

Investigadora en ciencias médicas "D" SNI II

Dr. C. M. Israel Pérez Torres

Investigador en ciencias médicas "C" SNI I

Dr. Valentín Herrera Alarcón

Jefe del departamento de Cirugía Cardiorádica

MEXICO, D. F.

AGOSTO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DR. JOSE FERNANDO GUADALAJARA BOO**  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ"



---

**DR. VALENTIN HERRERA ALARCON**  
JEFE DEL SERVICIO DE CIRUGIA CARDIACA ADULTOS  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE  
ESPECIALIZACION EN CIRUGIA CARDIOTORACICA  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ"

---

**DRA. C. M. MARIA ELENA SOTO LOPEZ**  
ASESOR METODOLOGICO Y ESTADISTICO DE TESIS  
INVESTIGADORA EN CIENCIAS MEDICAS D  
SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES SNI-II  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ"

---

**DR. C. M. ISRAEL PEREZ TORRES**  
BIOLOGO MOLECULAR  
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MEDICAS C  
SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES SNI-I  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ"

## INDICE

	Pág.
<b>Glosario</b> .....	<b>4</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>5</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>7</b>
<b>Marco Teórico</b> .....	<b>9</b>
Recomendaciones de tratamiento quirúrgico según las guías de manejo de enfermedades de aorta torácica.....	<b>13</b>
<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>15</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>16</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>16</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>16</b>
<b>Material y Métodos</b> .....	<b>17</b>
Diseño de estudio.....	<b>17</b>
Población en estudio.....	<b>17</b>
Criterios de inclusión.....	<b>17</b>
Criterios de exclusión.....	<b>17</b>
<b>Metodología</b> .....	<b>18</b>
Homogenización de aorta.....	<b>18</b>
Determinación de ácidos grasos totales.....	<b>18</b>
Determinación de citrulina.....	<b>19</b>
Determinación de nitratos y nitritos.....	<b>19</b>
Inmunotransferencia.....	<b>19</b>
Determinación de la actividad de la sintasa del óxido nítrico inducible.....	<b>20</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>21</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>37</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>40</b>
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	<b>41</b>

## Glosario

- *Aneurisma de raíz de aorta*: Dilatación localizada que produce una debilidad de todas las capas de la pared de la arteria, puede llegar a formarse en cualquier segmento arterial.
- *Disección de aorta*: Es un desgarro en la pared de la aorta que hace que la sangre fluya entre las capas de la pared de la aorta. Es una emergencia médica que puede conducir rápidamente a la muerte, incluso con un óptimo tratamiento.
- *Cirugía de Bentall y De Bono*: Si la válvula aórtica está afectada, se realiza esta técnica, que consiste en la resección de la válvula aórtica y se utiliza un injerto de dacron con una válvula mecánica o biológica que se fija al anillo aórtico, reemplazando la válvula y la raíz aórtica, reimplantando las coronarias.
- *Cirugía de Tirone-David (Resuspensión valvular)*: Si no hay daño estructural de la válvula aórtica, se utiliza alguna de las técnicas que permiten preservar la válvula.

## RESUMEN

El síndrome de Marfan (MFS) es un trastorno autosómico dominante del tejido conectivo, resultado de mutaciones en el gen que codifica a la fibrilina-1 (FBN-1), lo que conlleva a fibras elásticas anormales y causa microdissección y degeneración en la capa media de la aorta. En consecuencia hay formación de aneurismas y disección, que empeora el pronóstico e incrementan el porcentaje de mortalidad. La alteración en el estrés oxidante encontrada en la aorta dañada de estos pacientes, ha sido determinante para entender el mecanismo de daño. Uno de los factores que puede influir en la magnitud del daño aórtico es la peroxidación lipídica en la membrana. En pacientes con MFS, no ha sido estudiado, pero es conocido que la peroxidación lipídica, forma parte de la “cascada” en la activación de algunas enzimas. La glutatión peroxidasa (GSH-Px) recientemente se encontró disminuida. Debido a que la peroxidación lipídica con producción de radicales libres conlleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos a partir de los ácidos grasos (AG) insaturados, nuestro objetivo fue evaluar la participación de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) y su relación con los niveles de AG.

## MATERIAL Y METODOS

Es un estudio prospectivo, se incluyeron pacientes con criterios de Ghent para SM que tuvieron disección o dilatación de  $\geq 5$  cm que requerían cirugía correctiva. Un grupo control intervenidos por un problema valvular o congénito. Variables, como tiempo de evolución, tamaño de la dilatación aortica, edad género, CEC tiempo de pinzamiento, días de estancia hospitalaria, se retiraron medicamentos como AINES e hipolipemiantes. El tejido aórtico fue extraído durante la cirugía, homogeneizado, congelado en nitrógeno líquido y conservado a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Se midieron niveles de AG, iNOS, nitratos y nitritos, citrulina, factor transformante de crecimiento  $\beta 1$  (TGF-  $\beta 1$ ) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

## RESULTADOS

Se estudiaron 31 sujetos, 23 con MFS, de los cuales 12 (52%) fueron hombres y 11 (48%) mujeres. La relación H:M fue de 1:1 y 8 controles. De las cirugías, 17 (74%) fueron electivas y 6 (26%) de urgencia, el diámetro promedio del grupo en general fue de  $77 \pm 17$  mm. Hubo incremento con significancia estadística en MFS vs. control del ácido oleico ( $p=0.04$ ), expresión de la iNOS ( $p=0.05$ ), actividad de la iNOS ( $p=0.02$ ), el TGF

$\beta 1$  ( $p < 0.04$ ),  $TNF\alpha$  ( $p < 0.04$ ). Mostraron una tendencia al incremento, el ácido araquidónico (AA) ( $p = 0.06$ ), la actividad de la  $\Delta^9$ -desaturasa ( $p = 0.06$ ). El promedio de HDL fue encontrado bajo en la mayoría de los pacientes y la correlación con palmítico, esteárico y AG saturados tuvo correlación inversa de  $-0.59$ ,  $-0.44$  y  $-0.56$  respectivamente. Correlación positiva con oleico, linoleico, dihomogama, monosaturados y poliinsaturados de  $0.49$ ,  $0.49$ ,  $0.51$ ,  $0.48$  y  $0.53$  respectivamente.

## CONCLUSION

El incremento del ácido oleico se ha asocia con incremento en la expresión y la actividad de la iNOS,  $TNF-\alpha$  y  $TGF \beta 1$ , los cuales favorecen inflamación y esto puede estar en relación con el deterioro de la estructura aórtica y la formación de aneurismas.

## INTRODUCCION

El síndrome de Marfan (MFS por sus siglas en inglés), es un trastorno autosómico dominante del tejido conectivo, resultado de mutaciones en el gen que codifica a la fibrilina-1 (FBN-1). FBN-1 es componente principal de las microfibrillas extracelulares, que son cruciales como andamios organizadores en la formación y maduración de las fibras elásticas. Las fibras elásticas anormales, alteran la capacidad de soporte de carga, de la aorta y causan microdissección y degeneración en la capa media de la aorta y en consecuencia, la formación de aneurismas de la aorta torácica. La disección y ruptura del aneurisma aórtico representa más del 90% de la mortalidad en el síndrome de MFS (1,2,3).

El manejo clínico del aneurisma aórtico en el MFS tiene como objetivo disminuir la velocidad de dilatación de la raíz aórtica y reducir el riesgo de disección y ruptura. El bloqueo con  $\beta$ -adrenérgicos como atenolol, propranolol, etc., ha sido defendido como terapia preventiva (4,5).

Sin embargo, este tratamiento no impide importantes puntos finales clínicos, incluyendo insuficiencia aórtica, la cirugía, la disección aórtica y la muerte, y ningún beneficio clínico es observado en pacientes con dilatación importante o con disección (6,7,8,9).

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas eficaces para el manejo clínico de los aneurismas en la aorta torácica en el MFS, para lo cual se requiere determinar la patogénesis a través del análisis de los múltiples factores que pudieran estar participando.

Hasta ahora diversos mecanismos de daño han sido propuestos, sin embargo es claro que el aneurisma aórtico se caracteriza por deterioro de la función celular vascular, la destrucción de la integridad de la matriz extracelular y la disminución de las propiedades mecánicas de la pared vascular.

Asimismo, en modelos animales hay pruebas suficientes de que la progresión del aneurisma torácico en el MFS, se asocia con aumento de la metaloproteinasa (MMP) -2 y -9, las cuales participan en la degeneración de las fibras elásticas y en las alteraciones de las propiedades mecánicas de la aorta, disfunción endotelial y la reducción de la contractilidad del músculo liso (10,11).

Investigaciones recientes han demostrado que la perturbación de la vía de señalización del TGF- $\beta$ 1. El TGF- $\beta$ 1/Smad2 contribuye significativamente a las manifestaciones clínicas en el MFS. El antagonizar el TGF- $\beta$ 1, a través de anticuerpos neutralizantes con losartán (antagonista de los receptores AT1 a angiotensina), ha demostrado que puede

prevenir la degeneración de las fibras elásticas a aneurisma aórtico, dilatación de la raíz aórtica, prolapso de la válvula mitral, tabicación alveolar y alteraciones músculo esqueléticas. Por otro lado, hay poca evidencia de que el deterioro en la función contráctil y la relajación dependiente del endotelio, pueden ser el resultado de estrés oxidante en el aneurisma aórtico asociado con alteración del óxido nítrico (NO por sus siglas en ingles). El propósito de este estudio fue evaluar la participación de la iNOS en el aneurisma aórtico de los pacientes con MFS.

## **MARCO TEORICO**

El endotelio es una monocapa de células que reviste todo el sistema vascular tiene varias funciones esenciales, entre ellas la regulación del tono vascular, lo que permite la regulación exacta de la presión arterial y la perfusión tisular en valores normales. Esta función la ejerce el endotelio a través de la síntesis y secreción de un factor de relajación que ha sido identificado hasta ahora como el NO, sustancia gaseosa secretada fundamentalmente hacia el lado parietal del endotelio. El NO es sintetizado por la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés) a partir del aminoácido L-arginina, y actúa sobre diversos tejidos efectores como el músculo liso vascular y el músculo cardíaco, provocando su relajación, y sobre las plaquetas, en las cuales tiene un efecto antiadhesivo.

El NO es un gas simple que se libera por la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina. Para la síntesis de NO, además de L-arginina como sustrato, se requiere de la presencia de calmodulina (CaM) y de 4 cofactores: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (TBH) y de nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH). Esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), y puede ser inhibida por derivados estructurales de dicho aminoácido: la N-mono-metil-L-arginina (LNMMMA), la N-nitro-L-arginina metiléster (LNAME) y otros.

Cuando la CaM no se encuentra unida a la enzima, los electrones donados por el NADPH no fluyen desde el dominio reductasa hacia el dominio oxigenasa, y son aceptados por el citocromo C y otros aceptores de electrones. En presencia de la CaM los electrones donados por el NADPH son transportados por el FAD y por FMN hacia el grupo hemo. La L-arginina se convierte en N-hidroxialanina y luego en NO y L-citrulina.

En estas condiciones, las NOS producen una mezcla de aniones superóxido ( $O_2^-$ ), y el NO que reacciona con peroxinitritos ( $ONOO^-$ ) que contribuye a incrementar el estrés oxidante. En ausencia de TBH, las NOS generan peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), superóxido y NO. Los productos finales del NO "in vivo" son: nitrito ( $NO_2^-$ ) y nitrato ( $NO_3^-$ ). El mejor índice de NO total es la suma de ambos productos, debido a que la proporción relativa de cada uno de ellos dentro de una misma muestra resulta variable. La relación de  $NO_3^-/NO_2^-$  puede ser medida a través de sistemas colorimétricos que tiene un valor normal de 1.0  $\mu$ m.

El NO, una vez formado, puede difundir hacia las células subyacentes, donde activa a la enzima guanidilciclasa, y ésta provoca el aumento intracelular de GMPc, mediador de los

efectos fisiológicos. La síntesis de NO puede ser regulada por glucocorticoides y agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES) que reducen la producción de este gas, así como por los propios niveles de NO a través de mecanismos de retroalimentación negativa.

Se han identificado tres isoformas de NOS, constituidos por subunidades homodiméricas con pesos moleculares entre 125 y 155 KDa. Dos isoformas constitutivas calcio-dependientes (cNOS): la endotelial (eNOS) o tipo III y la neural (nNOS) o tipo I, presentes en diferentes tejidos (células endoteliales, neuronas, neuroglías y otros) que producen concentraciones fisiológicas de NO al actuar como señalizador molecular.

Una forma calcio-independiente (iNOS) o tipo II, inducible en un número de tipos celulares como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, músculo liso, endotelio en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como: interferón  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  y lipopolisacárido (LPS) bacteriano, los cuales generan gran cantidad de NO que puede ser tóxico en células tumorales o infectadas por virus. El conocimiento de esta amplia distribución de las NOS, ayudan a explicar algunos de los efectos en el organismo asociados con la liberación de NO <sup>(12)</sup>.

En las enfermedades inflamatorias los macrófagos activados secretan reactivos intermedios de oxígeno (ROI) y NO, lo cual puede resultar en la producción de ONOO<sup>-</sup> y/o radicales de OH. En esta reacción de NO con el grupo hemo en sitios catalíticos de las mitocondrias, enzimas citoplasmáticas y nucleares, pueden formar uniones covalentes irreversibles. En la artritis reumatoidea la producción aumentada de NO se evidencia por el incremento de los niveles de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en el líquido sinovial de dichos pacientes. Como se observa, el NO desempeña una importante función en la modulación de la respuesta inmune, posiblemente a través de la regulación diferencial de la síntesis de citocinas, macrófagos y otros tipos celulares que pueden inducir la formación de interferon  $\gamma$  y TNF  $\alpha$ .

El estímulo físico de mayor envergadura para la liberación de NO, es la presión de rozamiento o fuerza tangencial sobre la pared vascular, que se genera por el aumento del flujo dentro de la arteria y que conduce a una vasodilatación cuya magnitud es directamente proporcional a la cantidad de NO liberado por el endotelio. Depende de la integridad del endotelio en individuos normales. Este mecanismo se hallaría alterado en pacientes hipertensos e hipercolesterolémicos debido a una disminución de la bioactividad de NO disminuyendo la respuesta al incremento del flujo sanguíneo,

desarrollando y/o manteniendo resistencia vascular periférica elevada en los hipertensos. A pesar de actividad disminuida de NO, se preserva la dilatación por presión de rozamiento en los hipercolesterolémicos, atribuible a otros factores vasoactivos endoteliales <sup>(13)</sup>.

Otros estudios, sugieren que a nivel de los vasos sanguíneos existe un factor físico que activa a los mecanorreceptores de la pared vascular, induciendo la síntesis de NO por las células endoteliales a partir de la eNOS. Demostrando que el NO liberado podría actuar de forma local en el músculo liso subyacente, con una vida media de pocos segundos en soluciones biológicas.

Lo expresado anteriormente indica que al aumentar la presión arterial, el roce de la corriente sanguínea sobre el endotelio vascular se incrementa y por tanto, la liberación de NO, que coincide con lo planteado por Navarro et al, en cuanto a que a altas presiones de perfusión el NO principal en la autorregulación local modulando la contractilidad miógena de la pared vascular.

Por otra parte, la sintasa del iNOS, desde una perspectiva funcional, es importante reconocer que la inducción de la iNOS de alto rendimiento por lo general ocurre en un ambiente oxidativo, por lo que los altos niveles de NO tienen la oportunidad de reaccionar con especies reactivas de oxígeno que conducen a la formación de ONOO<sup>-</sup> y toxicidad celular. <sup>(14)</sup>

Además, el NO puede regular por sí mismo la expresión y actividad de las NOS. En concreto, se ha demostrado que NO desempeña un importante rol regulador negativo (feedback negativo) sobre eNOS y por consiguiente en la función de las células endoteliales vasculares. Este proceso, conocido oficialmente como S-nitrosilación (*s-nitrosation*), ha demostrado inhibir de forma reversible la actividad eNOS en las células endoteliales vasculares. <sup>(14)</sup>

Este proceso puede ser importante ya que está regulado por las condiciones redox de la célula y por tanto, puede proporcionar un mecanismo para la asociación entre el "estrés oxidativo" y la disfunción endotelial. Además de eNOS, tanto nNOS y iNOS se han encontrado S-nitrosiladas, pero la evidencia para la regulación dinámica de las isoformas de NOS por este proceso es menos completa. Además, se ha demostrado que tanto nNOS y iNOS forman complejos ferrosos nitrosilo en los grupos hemo, que pueden actuar parcialmente para auto-inactivar estas enzimas en determinadas condiciones <sup>(15)</sup>. El paso limitante para la producción de óxido nítrico también puede ser la disponibilidad de L-

arginina en algunos tipos de células. Esto puede ser particularmente importante después de la inducción de iNOS <sup>(15)</sup>.

Por ejemplo el mecanismo adyacente a los aneurismas cerebrales puede ser debidos a una expresión anormal de nNOS, degradación de la matriz extracelular, incremento de la reacción pro inflamatoria o una deficiencia en la síntesis de capa de la elasticidad arterial. Estos cambios pueden resultar en una deficiencia en la remodelación vascular <sup>(15,16)</sup>.

En estudios recientes en modelos de ratón, se ha demostrado que el fenofibrato puede contribuir a la disminución del aneurisma abdominal aórtico (AAA) inducido por aterosclerosis y por Ang II debido a que regula el HDL en suero y los niveles de esfingosina-1 fosfato (S1P)-c y tiene activación asociada de las enzimas productoras de NO y la reducción de la inflamación de la aorta <sup>(17)</sup>.

Lo cual de acuerdo a este hallazgo un mecanismo no explorado es el de la participación de los AG, dentro de la patogénesis de los aneurismas aórticos. Los AG son componentes fundamentales de los fosfolípidos y esfingolípidos, moléculas que forman la bicapa lipídica de las membranas de todas las células. Tienen una función reguladora, ya que algunos AG son precursores de las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, moléculas con una gran actividad biológica, que intervienen en la regulación y control de numerosos procesos vitales, como la respuesta inflamatoria, regulación de la temperatura corporal, procesos de coagulación sanguínea, contracción del músculo liso, etc.

Se conoce que el daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas como los lípidos insaturados donde se produce el daño mayor, proceso que se conoce como peroxidación lipídica, lo cual afecta a las estructuras ricas en Ag poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular y se produce edema y muerte celular. La peroxidación lipídica representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el  $O_2^-$ , el  $H_2O_2$  y el  $OH^\cdot$ . <sup>(18,19,20)</sup>

Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son: a) La naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente inicializador, b) Los contenidos de la membrana en AG poliinsaturados y su accesibilidad, c) La tensión de oxígeno, d) La presencia de hierro, e) El contenido celular de antioxidantes (betacarotenos, alfatocoferoles, glutatión), f) La activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutatión peroxidasa (GSH-Prx). La cual fue recientemente encontrada muy disminuida, en estudios realizados en este grupo de Investigación.

Es importante hacer mención que una vez que se inicia, este proceso de péroxidación lipídica toma forma de “cascada”, con producción de radicales libres que lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos, a partir de los ácidos grasos insaturados; y una vez formados, estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos (21).

La alteración del estrés oxidante encontrada en la aorta dañada de estos pacientes ha sido una fase determinante para entender el daño desencadenado. Sin embargo, creemos que tiene vital importancia analizar cuál es la participación de la iNOS y que relación guarda con el metabolismo de los AG.

La constante expresión de genes con mutaciones, en los pacientes con MFS, lleva al paciente a un estado crónico de inflamación, que va alterando la estructura de la célula endotelial, llevando paulatinamente a la dilatación aórtica, y manifestándose en fases tardías de la enfermedad, en donde la intervención quirúrgica es una de las principales opciones de tratamiento. (22)

Como sabemos existen guías a nivel mundial, en donde se hacen las recomendaciones de acuerdo a ciertas características de los pacientes, y como bien sabemos se deben de tomar como sugerencia, sin embargo siempre se debe individualizar el caso, y estudiar exhaustivamente al paciente para obtener los mejores resultados.

## **Recomendaciones de diagnóstico y tratamiento para pacientes con síndromes genéticos de acuerdo a las Guías (22)**

### Clase I

1. Realizar ecocardiograma al momento del diagnóstico de MFS para determinar los diámetros de raíz de aorta y aorta ascendente, y 6 meses después para determinar si existe aumento de dichos diámetros (Nivel de evidencia C)
2. Estudios de imagen anual, si el paciente presenta estabilidad en los diámetros aórticos. Si el diámetro aórtico máximo es 4.5 o mayor, o si el diámetro aórtico muestra crecimiento significativo en cuanto a la medición basal, se pueden realizar los estudios con mayor frecuencia (Nivel de evidencia : C)

### Clase IIa

1. Considerar tratamiento quirúrgico de aorta en pacientes adultos con mutaciones en TG-FBR1 o TGFBR-2 y un diámetro aórtico de 4.2 cm o mayor por ecocardiograma transesofágico (diámetro interno), o de 4.4 a 4.6 cm o mayor por TAC o RM (diámetro externo). (Nivel de evidencia: C)
2. En mujeres con diagnóstico de SM en edad fértil, es razonable realizar el reemplazo de la raíz aortica y aorta ascendente como tratamiento profiláctico si el diámetro excede 4 cm. (Nivel de evidencia: C)
3. Si el área medida en centímetro cuadrados en un corte transversal de la aorta ascendente o raíz aórtica, dividida entre la altura del paciente en metros, excede un promedio de 10, el tratamiento quirúrgico está recomendado , ya que se ha visto que pacientes más pequeños, presentan disecciones con diámetros más pequeños, y el 15 % de los pacientes con MFS presentan disecciones con diámetros menores a 5 cm. (Nivel de evidencia: C)

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El MFS es una enfermedad rara que tiene una alta incidencia de morbilidad y mortalidad cardiovascular, debido a que los pacientes desde el nacimiento y durante su desarrollo pueden presentar dilatación, disección y/o ruptura de la pared aórtica.

Es un problema de salud pública, debido a que las complicaciones cardiovasculares de este padecimiento ocurren en sujetos jóvenes en la edad productiva y la diversidad del daño cardíaco va desde alteraciones del sistema de conducción, daño valvular hasta la presencia de aneurismas

En los médicos de primer contacto hay poco conocimiento de esta enfermedad y en relación a los pacientes aunque tienen diversidad en la expresión clínica y presentan daño en el sistema ocular, músculo esquelético y dental además de la patología cardíaca no manifiestan en la gran mayoría sintomatología inmediata, lo cual en conjunto conlleva a que haya retraso en el diagnóstico.

En la mayoría de las ocasiones el diagnóstico se establece hasta que ocurre insuficiencia valvular principalmente aórtica y la disección del aneurisma.

Cuando los pacientes se diagnostican hasta que se encuentran en este estado catastrófico requieren de cirugía urgente lo cual implica mal pronóstico e incremento en los costos económicos y sociales de la familia y de las Instituciones que los atienden.

Por lo tanto se requiere de estrategias tanto para incrementar la acuciosidad diagnóstica, como para proponer estudios de investigación para evaluar los posibles mecanismos involucrados en el daño aórtico. En el MFS, el daño en general se ha atribuido a diversas mutaciones en el gen de la fibrilina 1 (FBN1) y de mutaciones en los receptores de TGFB1 y TGFB2. Sin embargo dentro de otros posibles mecanismos que participan en el daño aórtico recientemente se ha encontrado que estos pacientes tienen capacidad antioxidante disminuida e incremento de la lipoperoxidación, sin embargo no se conoce qué papel juegan en el daño aórtico los ácidos grasos saturados mono insaturados y polinsaturados en el daño aórtico de estos pacientes ni el papel que estos tienen en la producción y regulación del NO

## **JUSTIFICACION**

De acuerdo a las funciones metabólicas de la iNOS es importante determinar que posible papel juegan los ácidos grasos, los cuales forman parte de estructuras más complejas como los fosfolípidos y glucolípidos y se conoce que intervienen en mecanismos importantes en la permeabilidad celular. Es conocido también que debido a su carácter anfipático se unen a proteínas facilitando su inserción en la bicapa lipídica de la membrana celular y finalmente al ser usados como combustible metabólico de reserva y al actuar como mensajeros intracelulares, es importante determinar cuál es su verdadera participación en el daño aórtico de aneurismas en enfermedades del tejido conectivo.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACION**

¿El estudio de los AG en el tejido aórtico de los pacientes con MFS nos permitirá obtener información del papel que juegan en el mecanismo de daño arterial y si esto está relacionado con participación de la iNOS?

## **HIPOTESIS**

Los AG participan en procesos inflamatorios y en los aneurismas aórticos de los pacientes con MFS podrían ser parte del mecanismo de daño arterial y se ha descrito que hay participación de la iNOS y esta puede guardar correlación con AG TNF- $\alpha$  y TGF-B1.

## **OBJETIVO PRIMARIO**

Determinar si existe participación de la iNOS en el tejido aórtico con aneurisma

Objetivos particulares

- Evaluar los niveles de AG totales.
- Evaluar la relación de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ , y citrulina.
- Determinar la expresión de la iNOS en el aneurisma aórtico.
- Cuantificar la actividad de la iNOS en el aneurisma aórtico.
- Evaluar la correlación de los niveles con factores clínicos.
- Determinar si existe correlación del tiempo de evolución de la enfermedad y los niveles séricos de AG totales,  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ , citrulina y expresión de iNOS.
- Determinar si tiene participación con TGFB1 y el TNF- $\alpha$

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Diseño de estudio**

Estudio prospectivo observacional en una sola cohorte.

### **Población de estudio**

- ➔ Pacientes sometidos a cirugía correctiva de aneurisma aórtico.
- ➔ Pacientes que cumplieron con los criterios de Ghent para ser clasificados como MFS a su valoración al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez captados en la clínica de Aorta, los cuales fueron analizados por Reumatóloga experta.
- ➔ Estos pacientes candidatos a cirugía, son aquellos que se hayan presentado previamente en sesión medico quirúrgica, debido a que presentan una dilatación  $\geq 5$  cm o que hayan acudido por primera vez con dilatación y/o disección aortica a los cuales se les explicará en qué consiste el estudio y posteriormente se entregará carta de consentimiento informado.
- ➔ El grupo control será tomado de voluntarios que serán intervenidos por un problema valvular o congénito en el que la aorta forme parte de la resección quirúrgica

Se incluirán las variables, como tiempo de evolución, tamaño de la dilatación aortica, edad género, CEC tiempo de pinzamiento, días de estancia hospitalaria, tiempo de evolución entre el diagnóstico y la fecha de cirugía.

### **Criterios de Inclusión**

Tejido aórtico de sujetos con MFS, que cumplieron con > de dos criterios mayores y más de dos menores que hayan aceptado ser sometidos a cirugía de aorta en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Se retiró cualquier medicamento que podría interferir con el resultado, como el uso de AINES, o hipolipemiantes de cualquier tipo

### **Criterios de exclusión**

Tejido aórtico de pacientes que se llevaron a procedimiento quirúrgico de aorta (procedimiento de Bentall y De Bono o procedimiento de David), obteniendo una cantidad insuficiente de muestra para realizar todas las determinaciones.

## **METODOLOGIA**

### **Homogenización de aorta torácica**

El segmento de aorta fue extraído durante la cirugía, congelado en nitrógeno líquido y conservado a -30°C hasta su utilización, posteriormente fue homogeneizado en nitrógeno líquido y se politronó con amortiguador de sacarosa (0.25 mM de sacarosa, 10 mM de Tris, 1 mM de etilendinitrilotetracetato disódico (EDTA) a pH 7.35), en presencia de inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 2 µM pepstatina A, 2 µM leupeptina y 0.1% de aprotinina) se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se separó y almacenó a -30°C. La determinación de las proteínas totales del homogeneizado se realizó según el método descrito por Bradford (cita).

### **Ácidos grasos totales (AGT)**

La extracción de los AGT se realizó de acuerdo al método descrito por Folch (cita). A 100 µg de proteína del homogenizado aórtico se le agregaron 100 µg de ácido nonadecanoico como estándar interno y 2 ml de cloroformo-metanol (2:1, vol/vol) con 0.002% de BHT, Los AGT fueron transesterificados a metilesteres de AGT calentando a 90°C por 2 horas con 1.860 ml de metanol, y 40 µl de ácido sulfúrico concentrado y 0.002% de BHT. Los metilesteres de AGT fueron separados e identificados por cromatografía de gas-FID

en un cromatógrafo marca Carlo Erba Fratovap 2300 equipado con una columna capilar SP-2330 (30m largo x 0.25 mm de diámetro) y acoplado con un detector de flama ionizante a 210°C, con un flujo constante de helio 1.2 ml/min.

### **Citrulina**

A 100 µg de proteína del homogeneizado aórtico, se le agregó 50 µl de ureasa (12 mg/ml) y se incubó por 30 min a 37°C al finalizar el período de incubación se le agregó 1 ml de mezcla crómica. (25% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 9.24 mM de FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0.125% de 2,3-butadiona monoxima y 0.0075% de tiosemicarbazida), se mezcló en vortex y se incubó a 100°C durante 10 minutos. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se midió la absorbencia a 530 nm. La curva de calibración se realizó con una solución estándar de L-Citrulina 1nM (Sigma).

### **Nitratos y Nitritos**

Los nitratos fueron reducidos a nitritos mediante la reacción enzimática con nitrato reductasa. A 100 µg de proteína del homogeneizado aortico se le agregaron 20 µl de NADPH 2.4 mM, 10 µl nitrato reductasa (0.005 unidades) y 30 µl de aortiguador de KHPO<sub>4</sub> 0.14M, pH 7.35, se incubó por 30 min a 37°C, al finalizar el período de incubación se le agregó 200 µl de sulfanilamida 1% y 200 µl de N-naftil-etildiamina 0.1%, el volumen total fue ajustado a 1 ml. La curva de calibración fue obtenida con solución de KNO<sub>2</sub> de 5 a 0.156 nM. La absorbencia fue medida a 540 nm.

### **Inmunotransferencia**

75 µg de proteína del homogeneizado aortico se mezcló con amortiguador de carga (glicerol-Tris-HCl 59% vol/vol, SDS 1%, azul de bromofenol 0.01% y 2-mercaptoetanol 0.05%, pH 6.5). La mezcla se calentó a 100°C por 1-2 min. Las proteínas se separaron en gel de SDS/PAGE al 8% bajo condiciones reductoras, al final de la electroforesis, el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa Hybond-P 45 µm. La membrana se bloqueo durante 3 horas con TBS que contenía 5% de leche deshidratada desgrasada y 0.05% de Tween 20. Después, la membrana se incubó toda la noche con anticuerpos

policlonales primarios de conejo contra iNOS a una dilución de 1/300 a 4°C y agitación continua. Después la membrana fue enjuagó tres veces con TBS y se incubó con una dilución de 1/1000 de anticuerpos policlonales secundarios anticonejo por dos horas a temperatura ambiente y se reveló con 3'3'diaminobencidina. Después de la identificar a la iNOS, la membrana se lavó con amortiguador que contenía Tris 1%, SDS 1% y  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM, pH 2 por 2 horas, después se lavó con TBS, se bloqueó tres horas y se incubó toda la noche con una dilución de 1/1000 de anticuerpos biotinilados monoclonales de ratón contra  $\alpha$ -actina y se reveló con 3'3'diaminobencidina. La membrana fue analizada por densitometría mediante el programa 1D Image analysis software Windows versión 3.5 (Scientific Imaging Systems Eastman, Kodak Company, Rochester, NY).

### **Actividad de la sintasa del óxido nítrico inducible**

La actividad de la iNOS se cuantificó por oximetría mediante un electrodo tipo Clark, 100  $\mu$ g de proteína del homogeneizado aórtico se incubó a 37°C por 5min con 2 ml de amortiguador que contenía; HEPES 50 mM, CaM 10 unidades, BH<sub>4</sub> 10  $\mu$ M, CaCl<sub>2</sub> 2mM, L-arginina 10  $\mu$ M, NADPH 1mM, FAD 1mM, pH 7.35, La curva de calibración se realizó con KI 0.1M en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1M en presencia de KNO<sub>2</sub> 5 a 80 nM.

#### Interleucinas

El TGF- $\beta$ 1 y el TNF- $\alpha$  fueron cuantificados por ELISA mediante kits comerciales obtenidos por Elabscience (Cat No. E-EL-ROO19) y Enzo Life Sciences (Cat No. ADI-900-155), respectivamente.

## **RESULTADOS**

Se estudiaron 31 sujetos, 23 con MFS de los cuales 12 (52%) fueron hombres y 11 (48%) mujeres la relación H: M fue de 1:1 y 8 controles.

La mediana de edad de los grupos (casos y controles) fue de 33, Max –min (24-57) y 52 (1-72) respectivamente y la mediana de edad de hombres y mujeres tuvo una mediana de 33 (26-57) y 33 (24-49) respectivamente. Todos los sujetos cumplieron con > de 2 criterios de Ghent y la mediana de criterios menores fue de 3 (1-5). Las características demográficas de los pacientes con síndrome de Marfan se muestran en Tabla 1. Las características de laboratorio de los pacientes se muestran en Tabla 2.

En relación al tipo de cirugía de los pacientes 17 (74%) fueron electivas y 6 (26%) fueron de urgencia, el diámetro promedio del grupo en general fue de  $77 \pm 17$  mm. Solo hubo una defunción, se trato de una mujer con síndrome disecante de arco aórtico, roto con dilatación de 70 mm, prolapso valvular mitral y tricúspide, insuficiencia pulmonar, la cual falleció durante el intento de iniciar la cirugía. En los pacientes que tuvieron CEC la mediana fue de 172 (142-284) y el tiempo de pinzamiento fue de 145 (100-200). Del grupo en general el tiempo de cirugía tuvo una mediana de 5 (2 -12) y el promedio de sangrado 710 ml (320-4000 ml)

El promedio general de días de estancia hospitalaria fue de  $34.7 \pm 28.5$  y fue similar entre aquellos que llegaron con disección aortica y los que no la tuvieron fue de  $35 \pm 29$  y  $34 \pm 29$ .

Sin embargo de acuerdo al tipo de procedimiento, a los que se les realizó Bentall y Bono (BB) tuvieron una estancia hospitalaria con una mediana de 27 (1-130) días, procedimiento de David de 25 (17-32) y a los que se les realizó sustitución abdominal fue de 54 (19-90)

En la figura 1 se muestra el tipo de cirugía realizada y si tuvieron o no disección aórtica.

Figura 1

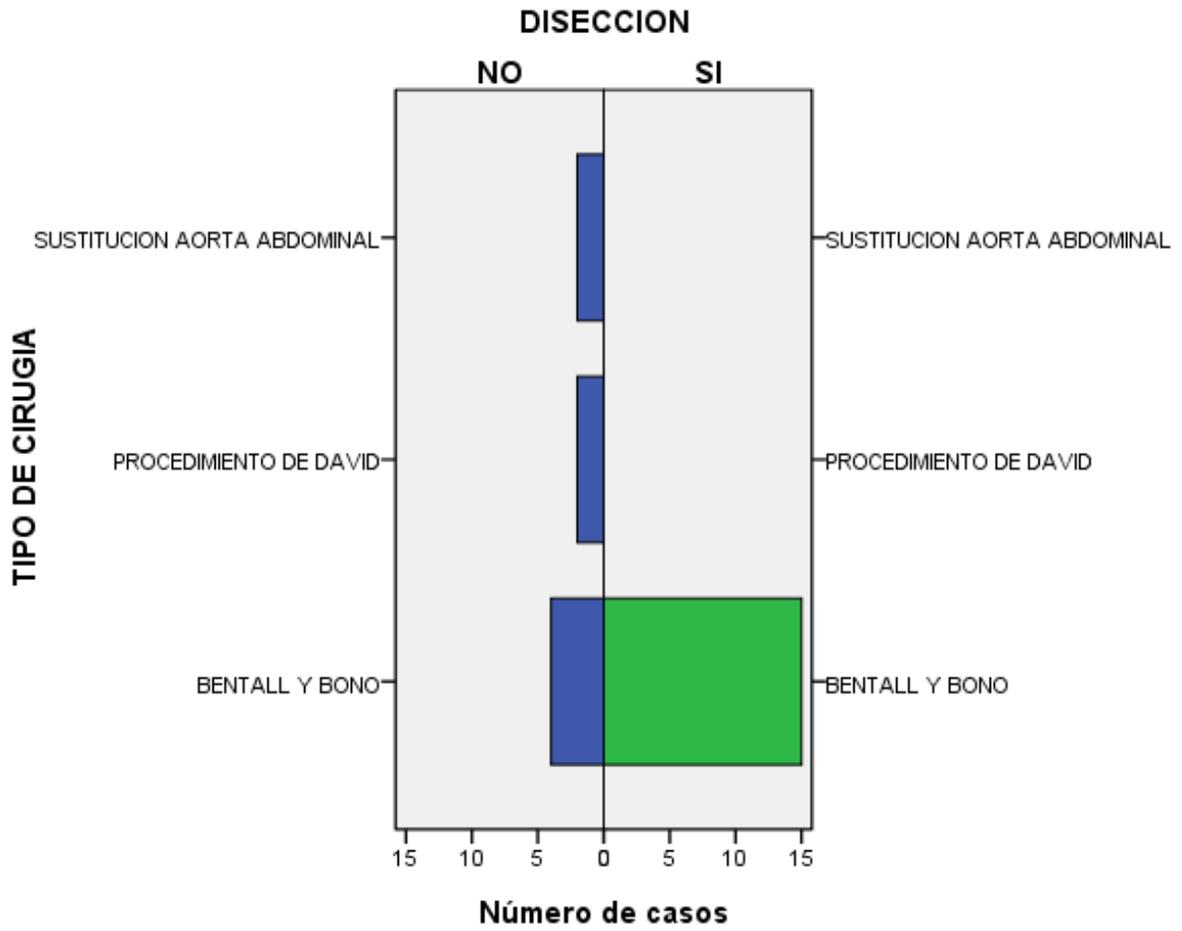


Figura 1. Relación entre la cirugía realizada y la presencia de disección aórtica.

**Tabla 1. Frecuencia de características clínicas y demográficas de los pacientes**

<b>Características</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
<b>Antecedentes de síndrome de Marfan en la familia</b>		
Con antecedente familiar del síndrome	11	(48)
Caso índice ( sin antecedente del síndrome)	12	(52)
<b>Deformidad del tórax</b>		
Sin deformidad	7	(30)
Con pectum excavatum	6	(26)
Con pectum carinatum	10	(44)
<b>Luxación de cristalino</b>	18	(78)
<b>Con &gt; de 7 / características musculo esqueléticas y sistémicas</b>	23	(100)
<b>Dilatación aortica</b>	23	(100)
<b>Tipo de Cirugía</b>		
Bentall y Bono	19	(83)
Procedimiento de David	2	(9)
Sustitución Ao abdominal	2	(9)
<b>Con disección aórtica</b>	15	(65)
<b>Tipo de Disección</b>		
Stanford A Debakey II	8	(34)
Stanford A DeBakey I	7	(30)
Sin disección	8	(34)
<b>Lugar de Origen</b>		
Distrito Federal	9	(39)
Puebla	3	(13)
Guanajuato	3	(13)
Tlaxcala	2	(9)
San Luis Potosí	1	(4)
Oaxaca	1	(4)
Durango	1	(4)
Morelia	1	(4)
Zacatecas	1	(4)
Hidalgo	1	(4)

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los pacientes estudiados

---

**Tabla 2. Promedios de biomarcadores de laboratorio previos a la cirugía.**

	Mediana ( Min-Max)	
<b>Proteina C reactiva</b>	32.5	(26-220)
<b>HDL</b>	33	(14-58)
<b>LDL</b>	86	(40-130)
<b>Colesterol total</b>	141	( 55-218)
<b>Trigliceridos</b>	98	(55-463)

**HDL = High Density Level, LDL= Low  
Density level, TG**

---

Tabla 2. Promedios de biomarcadores prequirúrgicos de los pacientes estudiados

Tabla 3. Muestra el resultado de ácidos grasos totales (AGT) entre casos y controles. El porcentaje de los AGT en ninguno de los ácidos grasos presentó diferencia significativa en los pacientes MFS comparación con los sujetos C, excepto en el ácido oleico, el cual mostró incremento significativo ( $p=0.04$ ) en los pacientes con MFS en comparación con los sujetos C, otro ácido que mostró una tendencia a incrementarse sin alcanzar diferencia significativa en los pacientes con MFS en comparación con los sujetos C, fue el ácido araquidónico ( $p=0.06$ ). Los AGS y AGM presentaron una tendencia a aumentar y disminuir respectivamente sin alcanzar diferencia significativa entre MFS y C ( $p=0.06$ )- La actividad de la  $\Delta^9$ -desaturasa mostró una tendencia similar que la del ácido araquidónico ( $p=0.06$ ).

Tabla 3. Porcentaje de los ácidos grasos totales y índices de conversión en el homogeneizado del aneurisma aórtico.

Acido Graso %	C (n=7)	MFS (n=21)
PALMITICO	40.7 ± 3.5	35.5 ± 1.1
PALMITOLEICO	10.8 ± 1.9	7.5 ± 0.4
ESTEARICO	20.9 ± 4.3	16.0 ± 1.3
OLEICO	19.6 ± 3.9	<b>30.0 ± 1.8*</b>
LINOLEICO	5.2 ± 0.1	7.7 ± 0.5
α-LINOLEICO	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.05
DIHOMO-□- LINOLENICO	0.6 ± 0.4	0.4 ± 0.1
ARAQUIDONICO	0.4 ± 0.1	<b>1.0 ± 0.2**</b>
EICOSAPENTAENOICO	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
DOCOSAHEXAENOICO	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1
<i>Total</i>		
AGS	61.7 ± 5.6	<b>51.6 ± 2.0**</b>
AGM	30.5 ± 4.6	<b>37.6 ± 1.8**</b>
AGP	7.7 ± 1.1	10.8 ± 0.5
<i>Desaturases</i>		
Δ <sup>9</sup>	1.2 ± 0.4	<b>2.3 ± 0.3**</b>
Δ <sup>6</sup>	0.13 ± 0.1	0.06 ± 0.01
Δ <sup>5</sup>	2.0 ± 0.5	2.9 ± 0.3

C vs. MFS \*p=0.04, \*\*no significativo p=0.06

Las figuras 2 y 3 muestran que la concentración de citrulina y los NO<sub>3</sub>-NO<sub>2</sub> en los pacientes con MFS presentaron incremento significativo en comparación con los sujetos C (p=0.003 y p=0.02, respectivamente).

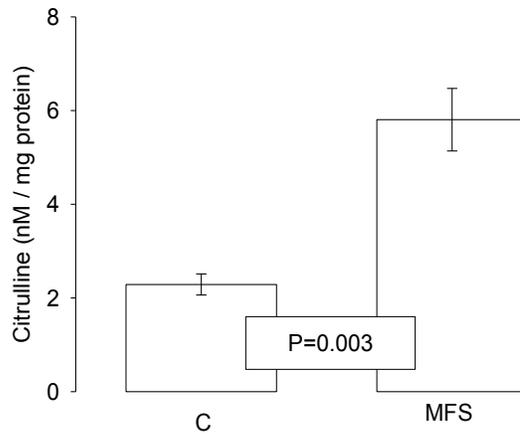


Figura 2. Concentración de citrulina en pacientes con MFS y sujetos control. La citrulina es el metabolito estable de las sintasas del óxido nítrico. Abreviaturas C= control, MFS= síndrome de marfan.

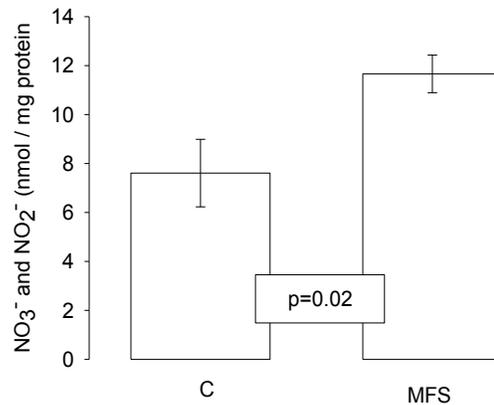


Figura 3. Concentración de nitratos y nitritos en homogeneizado del aneurisma aórtico de los pacientes control y con MFS. Los nitratos y nitritos son los metabolitos estables del óxido nítrico.

La expresión de la iNOS en los pacientes con MFS en comparación con los sujetos C mostró aumento significativo ( $p=0.05$ , Figura 4).

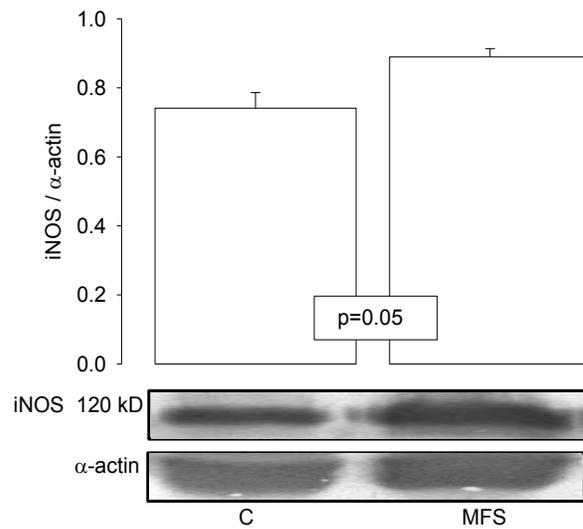


Figura 4. Expresión de la iNOS en el homogeneizado del aneurisma aórtico de sujetos control y pacientes con MFS. Abreviatura: C= control, MFS= síndrome de Marfan.

La actividad de la iNOS se incrementó significativamente en los pacientes con MFS en comparación con los sujetos C ( $p=0.02$ , Figura 5).

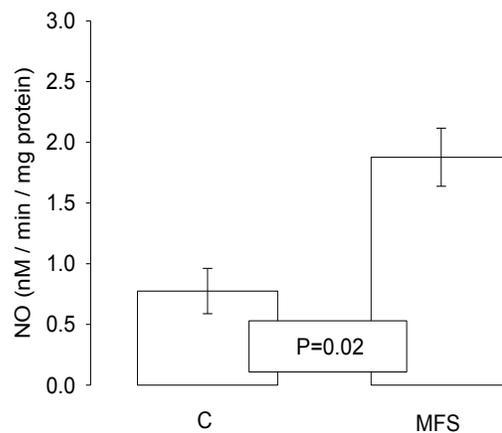


Figura 5. Actividad de la iNOS en el homogeneizado del aneurisma aórtico en sujetos control y pacientes con MFS. La actividad se realizó mediante un oxímetro acoplado con un electrodo tipo Clark.

El TGF- $\beta$ 1 y el TNF- $\alpha$  en los pacientes con MFS mostraron incremento significativo en comparación con los sujetos C ( $p < 0.04$  y  $p = 0.04$ , Figura 6 y 7 respectivamente).

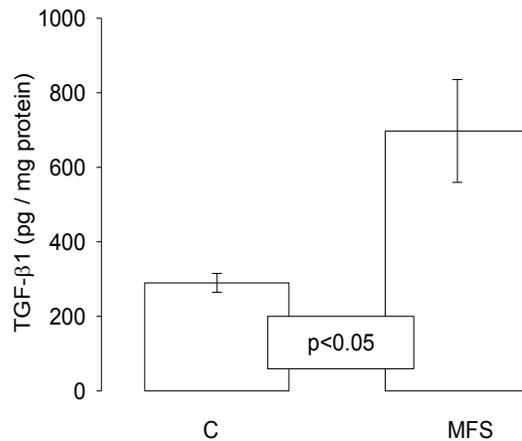


Figura 6. Concentración del TGF- $\beta$ 1 en el homogeneizado del aneurisma aórtico de sujetos control y pacientes con MFS.

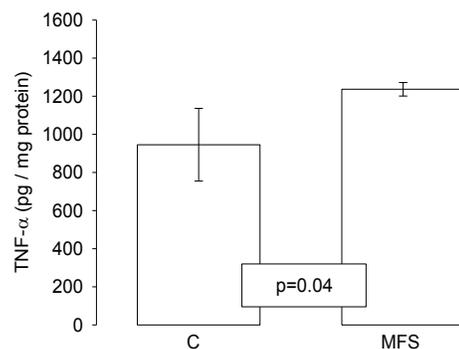


Figura 7. Concentración del factor de necrosis tumoral alfa en el homogeneizado del aneurisma aórtico de sujetos control y pacientes con MFS.

El promedio de HDL fue encontrado muy bajo en la mayoría de los pacientes y la correlación de este hallazgo con los ácidos grasos se muestra en tabla 4

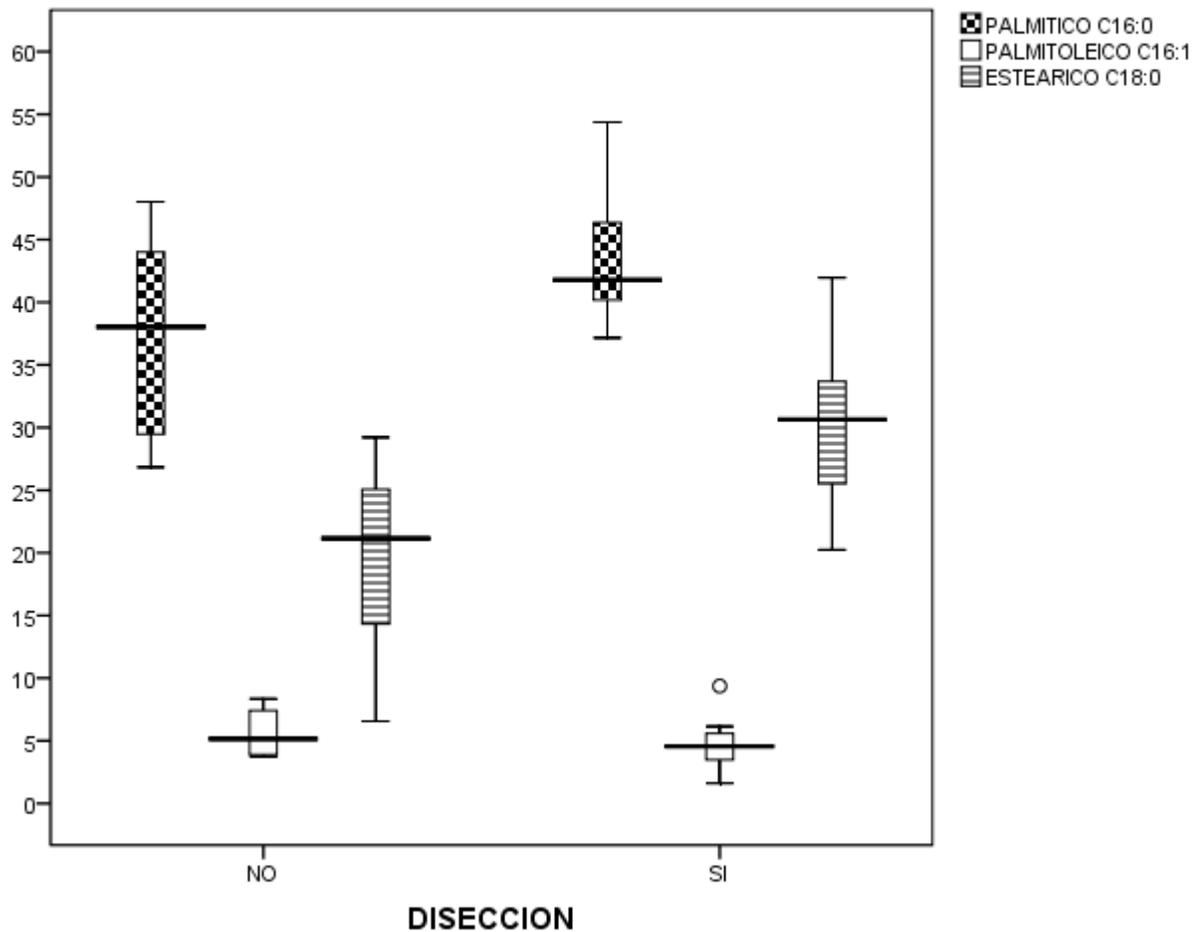
**Tabla 4. Análisis de los diversos biomarcadores de laboratorio solicitados previos a la cirugía de los pacientes y su correlación con los niveles de ácidos grasos.**

	HDL	LDL	CT	Triglicéridos	PCR
<b>Palmítico</b>	<b>-.59</b> (p = <b>0.007</b> )	-.33 (p = 0.15)	-.21 (p = 0.38)	<b>.48</b> (p = <b>0.03</b> )	.19 (p = 0.43)
<b>Palmitoleico</b>	.13 (p = 0.57)	.18 (p = 0.44)	.22 (p = 0.34)	.06 (p = 0.78)	-.11 (p = 0.64)
<b>Estearico</b>	<b>-.44</b> (p = <b>0.05</b> )	-.13 (p = 0.57)	-.22 (p = 0.35)	.16 (p = 0.50)	.26 (p = 0.26)
<b>Oleico</b>	<b>.49</b> (p = <b>0.03</b> )	.27 (p = 0.25)	.25 (p = 0.30)	-.27 (p = 0.25)	-.25 (p = 0.29)
<b>Linoleico</b>	<b>.49</b> (p = <b>0.04</b> )	.22 (p = 0.35)	.20 (p = 0.41)	-.30 (p = 0.20)	-.16 (p = 0.49)
<b>Gama L</b>	.35 (p = 0.13)	-.23 (p = 0.33)	-.10 (p = 0.66)	-.12 (p = 0.62)	-.02 (p = 0.92)
<b>Dihomogama L</b>	<b>.51</b> (p = <b>0.02</b> )	.04 (p = 0.99)	.02 (p = 0.90)	-.22 (p = 0.36)	-.06 (p = 0.79)
<b>Araquidónico</b>	.25 (p = 0.30)	-.16 (p = 0.49)	-.15 (p = 0.53)	-.25 (p = 0.28)	-.06 (p = 0.78)
<b>EPAC</b>	.38 (p = 0.10)	-.19 (p = 0.43)	-.15 (p = 0.53)	-.28 (p = 0.23)	.01 (p = 0.93)
<b>DHA</b>	-.24 (p = 0.32)	-.21 (p = 0.38)	-.19 (p = 0.43)	-.06 (p = 0.78)	-.04 (p = 0.84)
<b>Saturados</b>	<b>-.56</b> (p = <b>0.01</b> )	-.24 (p = 0.30)	-.24 (p = 0.32)	.33 (p = 0.15)	.25 (p = 0.29)
<b>Monosaturados</b>	<b>.48</b> (p = <b>0.03</b> )	.29 (p = 0.22)	.27 (p = 0.25)	-.27 (p = 0.26)	-.25 (p = 0.28)
<b>Polinsaturados</b>	<b>.53</b> (p = <b>0.01</b> )	.02 (p = 0.90)	.04 (p = 0.86)	-.39 (p = 0.09)	-.14 (p = 0.54)

Se analizaron los porcentajes de AG entre sujetos que cursaron con y sin disección aortica. Se encontró un incremento del esteárico en los que tuvieron disección aortica vs los que no tuvieron y esto tuvo significancia estadística  $p = 0.001$  U-Mann Whitney. Se muestran en Figura 8.

**Figura 8.**

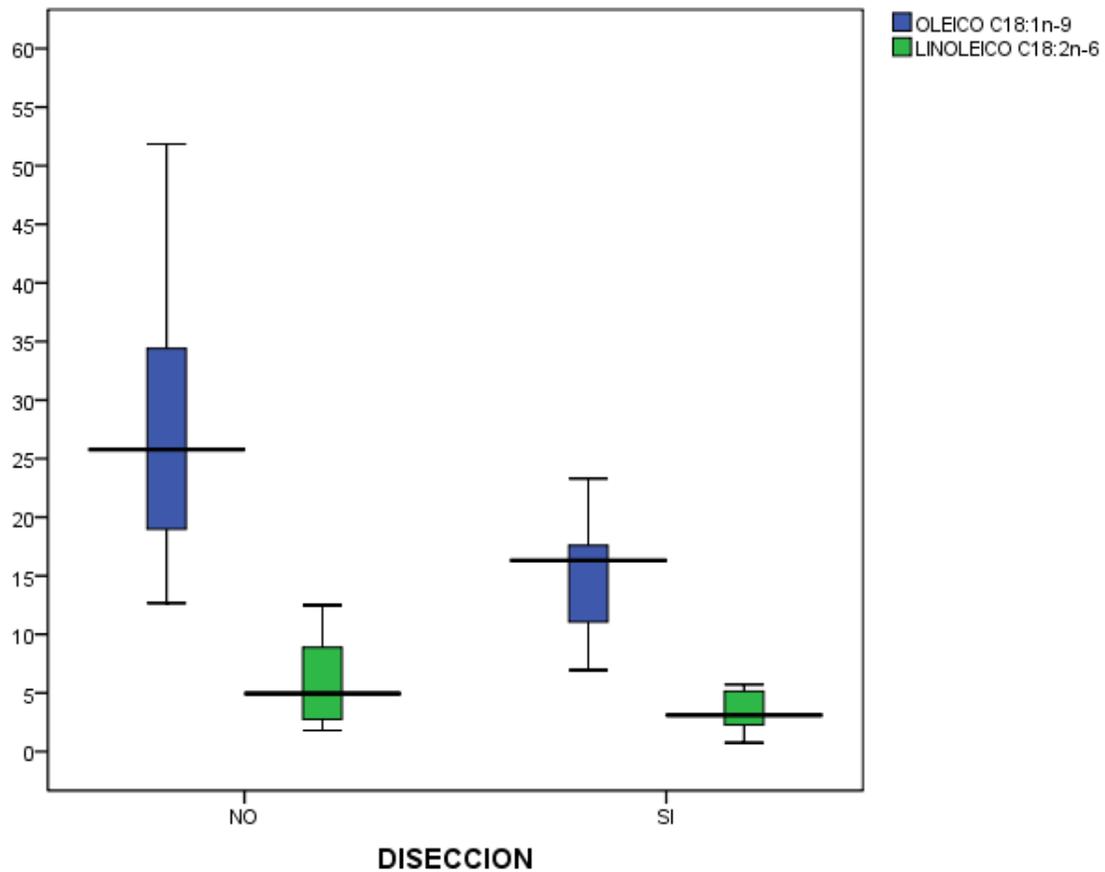
**Porcentajes de acidos grasos Palmitico Oleico y Estearico entre pacientes con Síndrome de Marfan que presentaron disección aortica vs los que no tuvieron diseccion aortica.**



En la Figura 9. se muestra que en aquellos sujetos que no tuvieron disección aortica el acido oleico tuvo un porcentaje o incremento más elevado que los que presentaron disección y esto tuvo diferencia estadísticamente significativa.  $p= 0.01$  (U- Mann Whitney).

**Figura 9.**

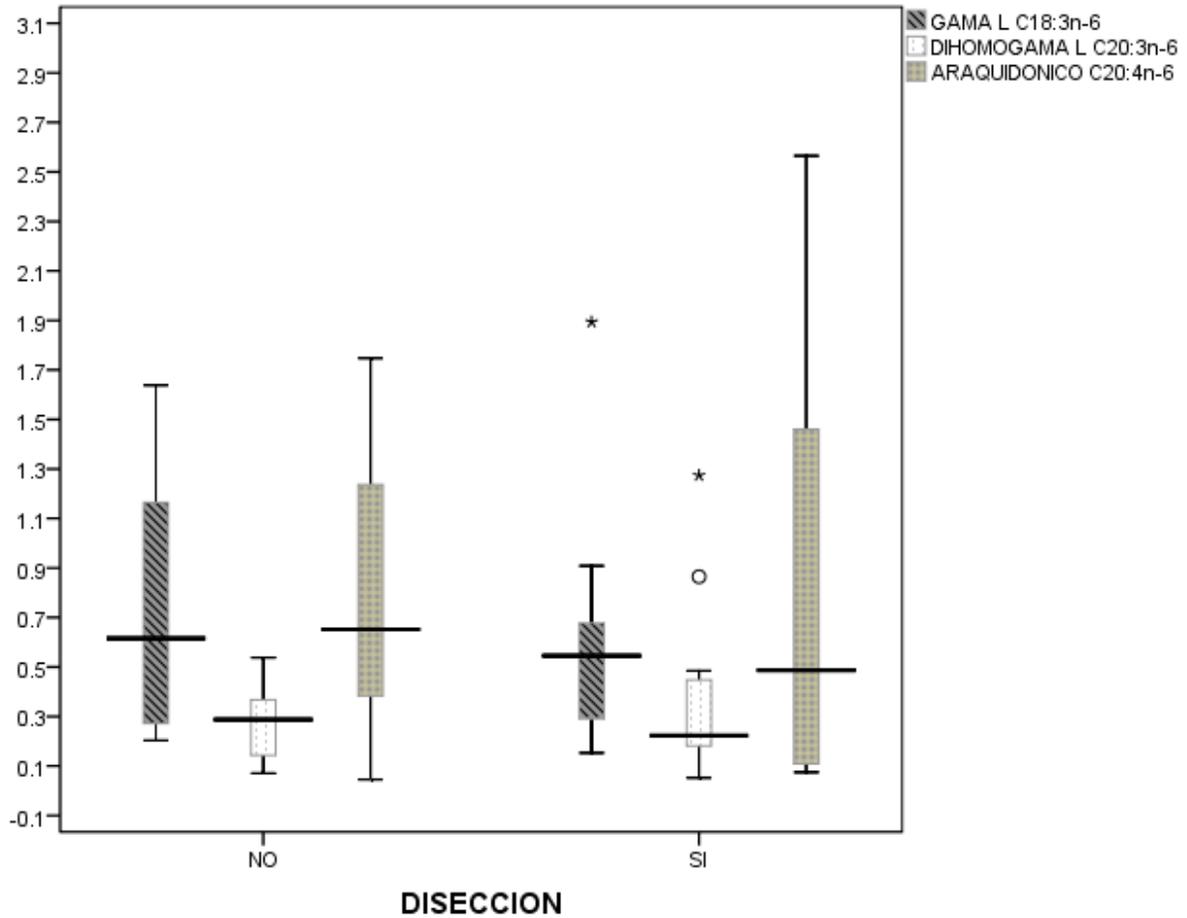
**Porcentajes de Acidos Oleico y Linoleico entre sujetos con Síndrome de Marfan que presentaron o no disección al momento de su Ingreso Hospitalario**



En la Figura 10, se muestra sin diferencias de Gama, Dihomogama y el ácido araquidónico entre sujetos que tenían o no disección. Lo cual podría resumirse que se encontraban sin diferencias.

**Figura 10**

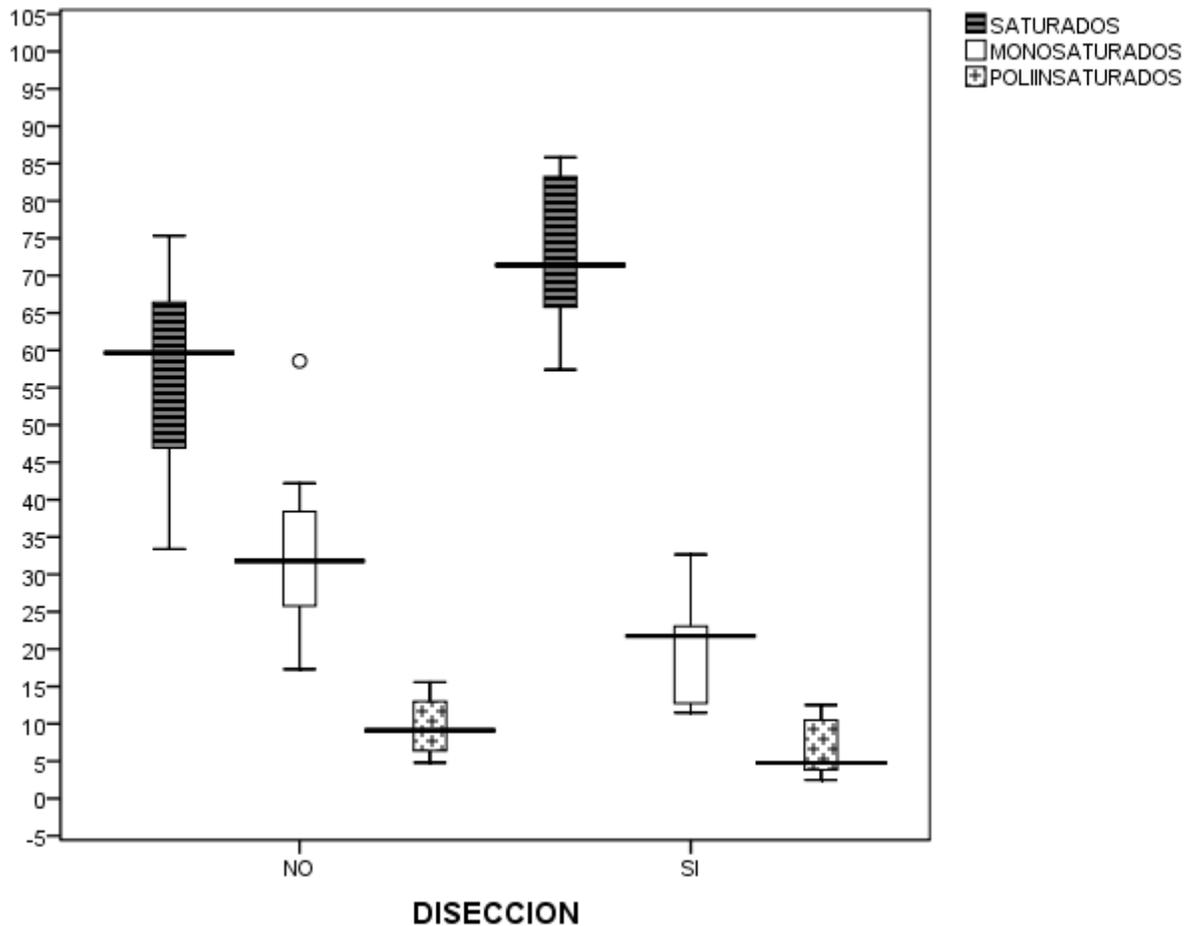
**Niveles de Gama, Dihomogama L y ácido araquidónico en pacientes con Síndrome de Marfan con y sin disección aórtica al momento de su cirugía.**



En la figura 11, se encontró que los ácidos grasos saturados fueron más elevados en los sujetos que presentaron disección aortica y esto muestra diferencia estadística significativa  $p = 0.007$  por otro lado los ácidos grasos mono saturados se encontraron disminuidos en sujetos con disección aortica.  $P = 0.006$

Figura 11.

**Porcentaje de Acidos grasos saturados, monosaturados y Polinsaturados entre individuos con Síndrome de Marfan que tuvieron disección o no previo a su cirugía.**



Todos los pacientes cursaron con necrosis quística de la media. En las figuras siguientes se muestra a manera de ejemplo la descripción histológica de un control y lo encontrado a nivel de fibras elásticas en la mayoría de pacientes con MFS.

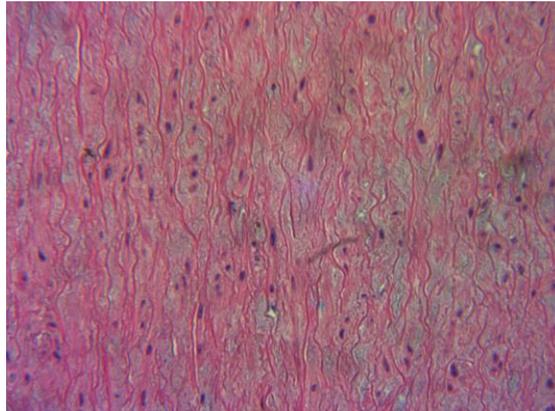


Figura 12. Control, tinción hematoxilina y eosina. Fotomicrografía de la capa media de la arteria aorta. Se observan las fibras elásticas en color rojo como cordones ondulantes, continuos que alternan con fibras de colágena en color rosa. Constituyen un entretejido que no deja espacios. HE 40x.

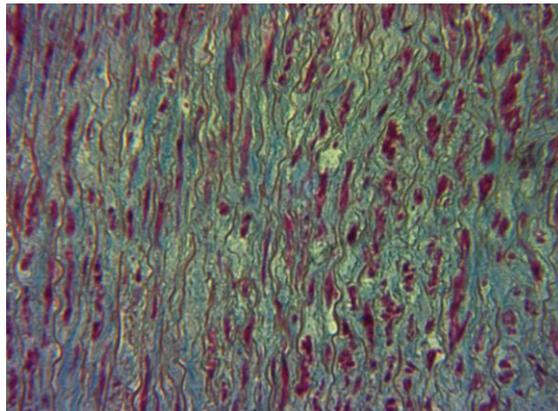


Figura 13. Control, tinción de Masson. Fotomicrografía de la capa media de la arteria aorta. Se observan las fibras elásticas en color rojo como cordones ondulantes continuos que alternan con fibras de colágena en color azul. Constituyen fascículos entrelazados que se disponen en la misma dirección. Masson 40x.

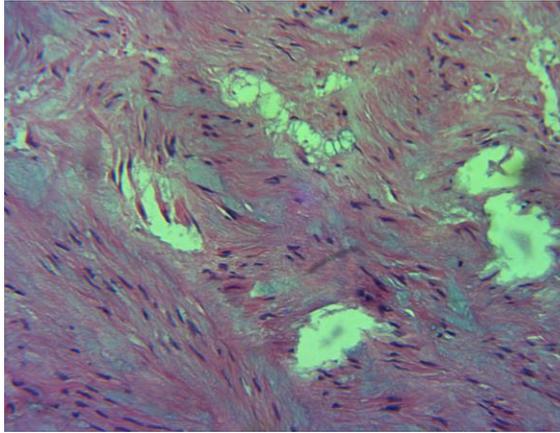


Figura 14. Marfan, tinción de hematoxilina y eosina. Fotomicrografía de la capa media de la arteria aorta. Se observan cavidades de color blanco, producto de la fragmentación de las fibras elásticas y de colágena. Corresponden a la llamada necrosis quística de la capa media aórtica. HE 40x

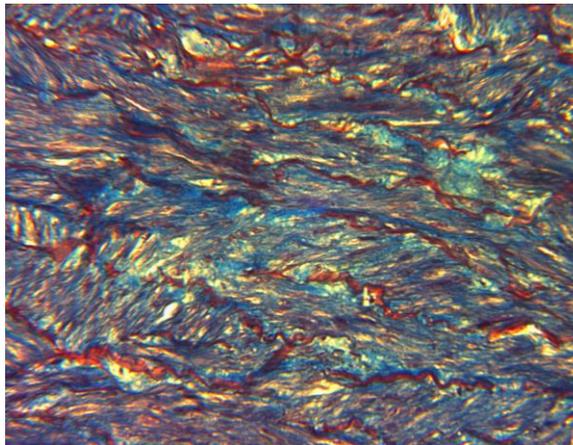


Figura 15. Marfan, tinción de Masson. Fotomicrografía de la capa media de la arteria aorta. En rojo las fibras elásticas como cordones ondulantes discontinuos o interrumpidos por fragmentación. En azul las fibras de colágena que se fragmentan y dejan espacios o cavidades en color blanco (necrosis quística inicial). Masson 40x.

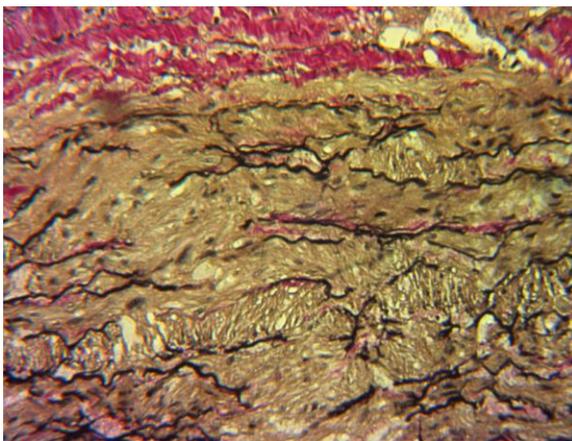


Figura 16. Marfan, tinción de fibras elásticas. Fotomicrografía de la capa media de la arteria aorta. Se observan las fibras elásticas en color negro, como cordones ondulantes que se interrumpen, producto de fragmentación. Alternan con fibras de colágena en color café que al fragmentarse dejan cavidades o espacios en color blanco (necrosis quística inicial). Fibras elásticas 40x.

## DISCUSION

El endotelio constitutivamente libera un número de mediadores vasoactivos como el NO, el cual regula la contractilidad del musculo liso, y de esta manera las propiedades del tono vascular. La disfunción endotelial y su retroalimentación negativa mediada por NO puede contribuir a la distensibilidad reducida, lo cual conlleva a diversas complicaciones en la aorta de pacientes con alteraciones genéticas y de la colágena como ha sido observado en el MFS. (23)

Recientemente se ha encontrado que el ácido oleico, el cual se encuentra en alimentos como el aceite de olivo tiene efectos sobre la vasodilatación mediada por flujo dependiente de endotelio (24), lo que contribuye a la disminución de LDL, colesterol total así como un aumento de HDL-C. (25,26,27)

Por lo tanto si las LDL son enriquecidas con ácido oleico estas partículas pueden estar menos disponibles para ser oxidadas. De esta manera estos múltiples efectos benéficos podrían servir para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, aunque cabe considerar que los mecanismos por los cuales se obtienen no son del todo conocidos. Sin embargo hay evidencias que indican que el ácido oleico es un agente asociado a inflamación y que abate la eNOS e incrementa la iNOS lo cual podría explicar algunos de los resultados encontrados en esta serie. Estos hallazgos son generadores de hipótesis y hacen necesario investigar cual es la verdadera participación de estos (28,29). Los resultados en esta serie sobre la disminución de los pacientes con HDL sugiere que el metabolismo del transporte reverso del colesterol esta alterado a pesar que no hay cambios en las LDL y apoya la hipótesis de que el incremento del ácido oleico está asociado a inflamación.

Por otro lado el ácido linoleico el cual es precursor del AA, uno de los principales constituyentes de aceite en plantas y los cuales son convertidos por cicloxigenasa y lipoxigenasa en varios eicosanoides por ejemplo prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos. (30, 31) El Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) y el leucotrienoβ<sub>4</sub>, los cuales se derivan del AA tienen propiedades proinflamatorias y protromboticas (32).

En esta serie el ácido linoleico no tuvo diferencias con los controles aunque se conoce de la participación en la conversión de los AG de cadena larga los cuales a su vez participan en las vías del AA, ácido eicopentanoico (AEP) y ácido docohexanoico (ADH) nosotros

interesantemente encontramos que el AA es el único incrementado al compararlo con controles la explicación podría estar dada por la producción elevada de AA, sin embargo debido al estrés oxidativo hay una relación inversa con las partículas de colesterol HDL (33,34)

En humanos, Cicero (35) mostró, que administrando suplemento con altas dosis de aceite de oliva por tres semanas disminuyeron el AA y el ácido linoleico (35).

La reducción del AA en suero y tejidos ha sido observada a través de uno de los mecanismos por el cual el ácido oleico actúa en una regulación inversa, lo cual podría ser obtenido a través de una retroalimentación metabólica más específica. Por ejemplo la reducción del porcentaje de AA podría ser esperado si el ácido oleico inhibe Delta 6 desaturasa, Elongasa-5, (Elovl-5) y/o Delta-5 desaturasa. Por otro lado la inhibición por el AA de Delta-9 desaturasa podría disminuir el porcentaje del ácido oleico. (36,37)

Parece ser que la Delta9-desaturasa tiene considerable significancia biológica, así la regulación de la cantidad de ácidos grasos mono insaturados (MUFA) tienen el potencial para afectar a una variedad de variables fisiológicas clave, como la de la sensibilidad a la insulina, adiposidad, aterosclerosis y obesidad y la vasodilatación mediada por flujo (38).

En este estudio en la medición realizada de ácidos grasos, encontramos que el porcentaje de los AGT pacientes con MFS vs. sujetos sanos no presentaron diferencias significativas sin embargo el ácido oleico, tuvo un incremento en los sujetos con MFS vs sanos con significancia estadística ( $p=0.04$ ). El AA mostró solo una tendencia al incremento en MFS vs sanos  $p= (0.06)$ . Del mismo modo esta tendencia al incremento fue observado en la actividad de la  $\Delta^9$ -desaturasa ( $p=0.06$ ). Como ya se ha demostrado en trabajos previos (33), el ácido oleico tiene un propiedades “cardioprotectoras”, al disminuir los niveles de LDL, mejorar los de la HDL, mejorar la sensibilidad a la insulina, y otros efectos anti-inflamatorios, además se ha encontrado una relación inversa entre el ácido oleico y el AA (proinflamatorio). Como se puede observar en nuestros resultados, esta relación inversa está perdida en los pacientes con MFS, habiendo elevación tanto de ácido oleico, Dada la doble participación que puede tener el oleico como anti y pro inflamatorio, en relación a nuestros hallazgos es evidente que los pacientes con SM cursan con un cuadro inflamatorio por tal razón una clave a investigar sería sobre los efectos inflamatorios del oleico en las

enfermedades vasculares y la inducción del ácido oleico sobre la iNOS proinflamatoria ya que como sabemos el óxido nítrico incrementado no es benéfico.

Se realizaron mediciones de citrulina,  $\text{NO}_3\text{-NO}_2$  e iNOS en los pacientes con MFS y se observó que presentaron incremento significativo en comparación con los sujetos Control. Se ha publicado que en las patologías aórticas, la presencia de aneurismas contribuye a una disfunción endotelial, con aumento en la relación de nitratos y nitritos, que además favorece el aumento de peroxinitritos, alterando la biodisponibilidad de óxido nítrico contribuyendo a modificaciones en el sistema vasomotor, manifestándose como hipertensión, habiendo un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Esta disfunción endotelial promueve el incremento en la formación de peróxido, llevando a una inactivación del óxido nítrico contra peroxinitritos. Esta reducción de óxido nítrico, disminuye los niveles de cGMP, y esto tiene una retroalimentación negativa en la señalización de segundos mensajeros del ON. Además de haberse demostrado una disminución en la expresión del eNOS <sup>(23)</sup>, sin embargo nuestros resultados evidencian que hay un aumento en la expresión de la iNOS, la cual se sabe es secundario a algún efecto pro inflamatorio, y de esta manera se demuestra el aumento en la susceptibilidad de complicaciones en las aortas de estos enfermos. Y principalmente al oleico que inhibe la eNOS e incrementa la iNOS.

Se encontró también una diferencia significativa entre la concentración de factor de crecimiento transformante  $\beta_1$ , y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , encontrándose elevado en los pacientes con MFS, en comparación con los pacientes control. Efecto conocido por los factores liberados, en el proceso inflamatorio de esta patología. El óxido nítrico desempeña una importante función en la modulación de la respuesta inmune, posiblemente a través de la regulación diferencial de la síntesis de citocinas. Macrófagos y otros tipos celulares que pueden inducir la formación de interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa, lipopolisacárido bacteriano, los cuales a su vez son productores de óxido nítrico <sup>(39)</sup>, mientras que la citrulina se ha considerado para ser un subproducto inerte resultado de la isoforma iNOS, se conoce que algunos estímulos inducen una ruta metabólica en las células del músculo liso vascular, lo que les permite regenerar arginina a partir de citrulina y este mecanismo debería ser potencialmente explorado<sup>(40)</sup>.

Las alteraciones del tipo de ácidos grasos podría ser atribuida a la dieta, sin embargo estos pacientes incluidos provenían de diferentes estados de la República y diferentes estratos socioeconómicos, lo cual indica que el tipo de dieta no interfiere sino el metabolismo de estos pacientes.

Un punto relevante a explorar es la de la 9 desaturasa, que interviene en el metabolismo del palmítico al palmitoleico y del esteárico al oleico, sugiere que probablemente que haya un deterioro en la actividad de esta enzima y que tenga importante participación en el metabolismo de ácidos grasos.

## CONCLUSION

El incremento del ácido oleico se ha asocia con incremento en la expresión y la actividad de la iNOS, TNF- $\alpha$  y TGF  $\beta$ 1, los cuales favorecen inflamación y esto puede estar en relación con el deterioro de la estructura aórtica y la formación de aneurismas.

## REFERENCIAS

1. Teixido-Tura G., et al. Determinants of Aortic Root Dilatation and Reference Values Among Young Adults Over a 20-Year Period: Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. Hypertension. 2015;66(1):3-9.
2. Juez M., et al. Surgical treatment of aneurysm of right aortic arch with cervical aorta. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2006;5(1):18-9.
3. Jones K., et al. Symposium on the musculoskeletal aspects of Marfan syndrome: meeting report and state of the science. J Orthop Res. 2007;25(3):413-22.
4. Clarebrough J., et al. Heterograft aortic valve replacement. Med J Aust. 1968;2(23):1029-33.
5. Shores J., et al. Progression of aortic dilatation and the benefit of long-term beta-adrenergic blockade in Marfan's syndrome. N Engl J Med. 1994; 330(19):1335-41.
6. Liu Z., et al. Aortic compliance in human hypertension. Hypertension. 1989;14(2):129-36.
7. Rios A., et al. Effect of long-term beta-blockade on aortic root compliance in patients with Marfan syndrome. Am Heart J. 1999 Jun; 137(6):1057-61.
8. Baumgartner D., et al. Different patterns of aortic wall elasticity in patients with Marfan syndrome: a noninvasive follow-up study. J Thorac Cardiovasc Surg. 2006;132(4):811-9.
9. Gersony D., et al. The effect of beta-blocker therapy on clinical outcome in patients with Marfan's syndrome: a meta-analysis. J Cardiol. 2007 18;114(3):303-8.
10. Chung A., et al. Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. C. Circ Res. 2007 31;101(5):512-22.
11. Chung A., et al. Long-term doxycycline is more effective than atenolol to prevent thoracic aortic aneurysm in marfan syndrome through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9. C.Circ Res. 2008 25;102(8):73-85.
12. Rebeca J. Nitric oxide. Molecular Medicine Today 1995;1(8):358
13. Buse et al. Mechanisms of shear stress-dependent NO release. Abstract for the Scand Physiol Soc Meet Berg 1994; (3):21-3.
14. Mungrue, et al. The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. Heart Fail 7 (4): 407–22).
15. Liu W., et al. Relationship between Abnormal NOS expression and the pathogenesis of cerebral aneurysm. Genet Mol Res. 2015; (28).
16. Liaw N., et al. Endothelial nitric oxide synthase and superoxide mediate hemodynamic initiation of intracranial aneurysms. PLoS One. 2014 3;9(7)

17. Krishna S., et al. Fenofibrate increases high-density lipoprotein and sphingosine 1 phosphate concentrations limiting abdominal aortic aneurysm progression in a mouse model. Am J Pathol. 2012;181(2):706-18.
18. Jerlick A., et al. Pathway of phospholipid oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS. Free Radic Biol Med 2000; 28(5):673-82.
19. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. Annu Rev Biochem 1997;58:79-110.
20. Reylli PM, Burkley GB. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. Br J Surg 1990;77:1324.
21. Rangon V., et al. Prospects for treatment of free radicals-mediated tissue injury. Br Med Bull 1993;49:700-18.
22. Hiratzka, L., et al. 2010 ACCF/ AHA/ AATS/ ACR/ ASA/ SCA/ SIR/ STS/ SVM Guidelines for the diagnosis and management of patients with thoracic aortic disease: Executive Summary. JACC. 2010; 55 (14): 1509-1544
23. Soto et al. Analysis of Oxidative Stress Enzymes and structural and functional proteins on Human Aortic tissue from different aortopathies . Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2014.
24. Ryan M., et al. Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity. QJM 2000, 93:85–91.
25. Gillingham L., et al. High-oleic rapeseed (canola) and flaxseed oils modulate serum lipids and inflammatory biomarkers in hypercholesterolaemic subjects. Br J Nutr 2010, 105:417–427. 3.
26. Damasceno N., et al. Crossover study of diets enriched with virgin olive oil, walnuts or almonds. Effects on lipids and other cardiovascular risk markers. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2011, 1(Suppl):S14–S20.
27. Estévez M., et al. HDL cholesterol levels in children with mild hypercholesterolemia: effect of consuming skim milk enriched with olive oil and modulation by the TAQ 1B polymorphism in the CETP gene. Ann Nutr Metab 2010, 56:288–93.
28. Egon D., et al. The Arachidonic Acid Metabolome Serves as a Conserved Regulator of Cholesterol Metabolism. Cell Metabolism. 2014;20(4):787-798.
29. Gilmore L., et al. Consumption of high-oleic acid ground beef increases HDL-cholesterol concentration but both high- and low-oleic acid ground beef decrease HDL particle diameter in normocholesterolemic men. J. Nutr. 2011; 141 (6): 1188-94.
30. Moncada S., et al. Arachidonate metabolism in blood cells and the vessel wall. Clin Haematol 1986, 15:273–292. 13.
31. Mayes P., et al. Metabolism of unsaturated fatty acids and eicosanoids. In Harper's Biochemistry. 25th edition. New York: McGraw-Hill; 2000:250–258.

32. Smith W., et al. The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxygenase pathways. Biochemistry of Lipids. Elsevier; 2008:331–362.
33. Torbjorn A., et al. Percentages of oleic acid and arachidonic acid are inversely related in phospholipids of human sera. Lipids in health and disease 2013, (12): 106.
34. Anatol K., et al. A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterised by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity. Atherosclerosis 2005 (182)277–285.
35. Cicero A., et al. Changes in LDL fatty acid composition as a response to olive oil treatment are inversely related to lipid oxidative damage. TheEUROLIVE study. J Am Coll Nutr 2008, 27:314–320.
36. Cedernaes J., et al. Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase 1 index is increased and linoleic acid is decreased In obesity-prone rats fed a high-fat diet. Lipids Health Dis. 2013 (8).
37. Araya J., et al. Decreased liver fatty acid delta-6 and delta-5 desaturase activity in obese patients. Obesity. 2010; 18 (7): 1460-3.
38. Pérez I., et al. Modification of the liver fatty acids by Hibiscus sabdariffa Linnaeus (malvaceae) infusion, its possible effect on vascular reactivity in a metabolic syndrome model. Clinical and experimental hypertension. 2014 (36).
39. Ferrer D., et al. Oxido nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. Medisan 1998; 2(3): 45-53.
40. Hattori Y., et al. Argininosuccinate synthetase mRNA and activity are induced by immunostimulants in vascular smooth muscle. Role in the regeneration or arginine for nitric oxide synthesis. J Biol Chem. 1994; 269 (13): 9405-8.