



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

*“Marcadores de estrés oxidativo en suero y su relación con la fibrilación auricular
en pacientes con enfermedad mitral”*

TRABAJO DE TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

MAURICIO KURI AYACHE

JESÚS ANTONIO GONZÁLEZ-HERMOSILLO GONZÁLEZ

TUTOR DE TESIS

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

MÉXICO D.F. FEBRERO DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	4
MATERIAL Y MÉTODOS	4
RESULTADOS	4
CONCLUSIÓN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCTION	5
METHODOLOGY	5
RESULTS	5
CONCLUSION	5
INTRODUCCIÓN	6
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS PARTICULARES	9
MATERIAL Y MÉTODOS	10
EVALUACIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO ANTIOXIDANTE A TRAVÉS DE LA MEDICIÓN DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD)	11
LIPOPEROXIDACIÓN A TRAVÉS DE LAS SUSTANCIAS REACTIVAS DEL ACIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	11
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL SISTEMA NO ENZIMÁTICO A TRAVÉS DE LA MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD REDUCTORA DEL CLORURO FÉRRICO EN PLASMA (FRAP)	11
DEFINICIÓN DE VARIABLES	12
Ø DEMOGRÁFICAS	12
Ø OPERACIONALES	12
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	13
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	13
DISEÑO DEL ESTUDIO, TAMAÑO DE LA MUESTRA Y ANALISIS ESTADISTICO	13

RESULTADOS	14
TABLA 1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	14
TABLA 2 CONCENTRACIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	15
FIGURA 1	16
FIGURA 2	16
FIGURA 3	17
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	18
BIBLIOGRAFÍA	19

RESUMEN

Introducción

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia sostenida más común. La FA es un problema mayor de salud pública por la morbilidad y la mortalidad asociada. Ha sido demostrado en recientes estudios la relación que existe entre la fibrilación auricular y el estrés oxidativo, así mismo entre el estrés oxidativo y la principal complicación de la fibrilación auricular que es el tromboembolismo sistémico. A pesar de lo anterior la relación temporal entre la fibrilación auricular y el estrés oxidativo aun no ha sido efectivamente demostrada.

Material y Métodos

Se seleccionaron pacientes procedentes de la consulta externa, consulta de arritmias y piso de hospitalización con enfermedad mitral (estenosis o insuficiencia) de grado severo. Con los resultados posteriormente se agruparon los sujetos en 3 grupos + 1 grupo control el cual se formó con sujetos voluntarios, sanos, donadores en el banco de sangre; Grupo 1: 8 sujetos sanos. Grupo 2: 12 sujetos con enfermedad mitral en ritmo sinusal. Grupo 3: 7 sujetos con enfermedad mitral con fibrilación auricular paroxística. Grupo 4: 11 sujetos con enfermedad mitral en ritmo de fibrilación auricular persistente/permanente. Se tomaron muestras de sangre de los sujetos las cuales posteriormente fueron centrifugadas y el plasma se congeló a -70° . Posteriormente se procedió a hacer el análisis de estrés oxidativo con las pruebas de SOD, FRAP y TBARS. Posteriormente se procedió a comparar los valores entre grupos con las pruebas de Mann-Whitney para comparar dos grupos y la prueba de Kruskal-Wallis para la diferencia entre grupos.

Resultados

En el análisis de SOD se observó una diferencia significativa en el análisis entre grupos ($p < 0.0001$), así mismo, se observó una concentración creciente, estadísticamente significativa al comparar grupo control Vs grupo 2 ($p = 0.042$), grupo 2 Vs grupo 3 ($p = 0.021$) y no así al comparar grupo 3 Vs grupo 4 ($p = 0.27$).

En el análisis de FRAP se observó un resultado similar al del SOD encontrando diferencia significativa en la actividad oxidativa entre grupos ($p < 0.0001$) y al comparar el grupo control Vs. el grupo 2 ($p = 0.002$), grupo 2 Vs grupo 3 ($p = 0.05$), sin embargo, no así al comparar el grupo 3 Vs grupo 4 ($p = 0.08$).

Al analizar la actividad oxidativa mediante el método de TBARS se observó una diferencia significativa entre grupos ($p < 0.0002$). Así también al comparar grupo control Vs grupo 2 ($p = 0.001$) y no así al comparar grupo 2 Vs grupo 3 ($p = 0.7$) o grupo 3 Vs grupo 4 ($p = 0.13$).

Conclusión

Los sujetos con enfermedad mitral presentan incremento en la actividad oxidativa. La presencia de dicho incremento es independiente del ritmo cardiaco presente, sin embargo, dicho incremento tiene a crecer en los sujetos que presentan fibrilación auricular en cualquiera de sus modalidades. Los sujetos con fibrilación auricular paroxística parecen tener actividad oxidativa similar a los que presentan fibrilación auricular permanente.

ABSTRACT

Introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained arrhythmia. AF is mayor public health problem because of the high morbidity and mortality associated with it. It has been recently shown that there is an association between AF and oxidative stress. It also has been shown that there is association between oxidative stress and systemic embolism in AF. It hasn't yet been shown what is the temporal relationship between AF and oxidative stress.

Methodology

We selected patients from the external consultation and the arrhythmias consultation departments of the National Institute of Cardiology. We selected patients with severe mitral disease (stenosis or regurgitation). Afterwards we proceeded to group the patients in those with sinus rhythm (group 2), those with paroxistic AF (group 3), those with permanent AF (group 4). We also selected a group of healthy subjects from the blood bank department (group 1).

Group 1: 8 subjects. Group 2: 12 subjects. Group 3: 7 subjects. Group 4: 11 subjects. We took blood samples from every subject, centrifuged them and stored them at -70°C .

When we completed the inclusion phase we proceeded to make the molecular analysis of the samples with the SOD, FRAP and TBARS tests, and we proceeded to compare the results from each between groups. We used the Mann-Whitney test to compare between two groups and the Kruskal-Wallis test to compare between all groups.

Results

When using the SOD test we observed a significantly different oxidative stress activity between groups ($p < 0.0001$), we also observed a rising activity, when comparing control group Vs. group 2 ($p = 0.042$), group 2 Vs. group 3 ($p = 0.021$) and not significant between group 3 Vs. group 4 ($p = 0.27$).

When using the FRAP analysis we observed a similar result. We found significantly different oxidative activity between groups ($p < 0.0001$), also when comparing control group Vs. group 2 ($p = 0.002$), group 2 Vs. group 3 ($p = 0.05$), and not significant when comparing group 3 Vs. group 4 ($p = 0.08$).

Finally when using the TBARS test we observed a different oxidative activity when comparing between groups ($p < 0.0002$). We also found rising activity between the control group Vs. group 2 ($p = 0.001$), but non different activity between group 2 Vs. group 3 ($p = 0.7$) or group 3 Vs. group 4 ($p = 0.13$).

Conclusion

Subjects with mitral disease show an increase in the oxidative stress activity. Such increase is irrespective of the cardiac rhythm of the subject, but the oxidative activity increases when the subject presents atrial fibrillation in any of its modalities.

Marcadores de estrés oxidativo en suero y su relación con la fibrilación auricular en pacientes con enfermedad mitral

Alumno. Mauricio Kuri Ayache

Tutor. Jesús Antonio González-Hermosillo González

Cotutor. Israel Pérez Torres

INTRODUCCIÓN

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia sostenida más común. Su prevalencia ha ido aumentando continuamente en las últimas décadas. La FA ha llegado a convertirse en un problema mayor de salud pública por la morbilidad y la mortalidad asociada.⁽¹⁾

A pesar de diversos y extensos estudios clínicos la fisiopatología de la FA permanece incompletamente conocida.⁽²⁾

Ha sido generalmente aceptado que la fibrilación auricular promueve la disfunción endotelial y la generación de radicales libres por la desorganización mecánica del movimiento auricular, sin embargo, en los años recientes con base en una nueva evidencia se ha cuestionado dicho concepto, argumentando que se ha observado la arritmia en pacientes con niveles oxidativos elevados aún en ausencia de fibrilación auricular o enfermedad estructural. Lo anterior permitió el surgimiento de diversas hipótesis, entre ellas, la de que es el estrés oxidativo y la disfunción endotelial la causa, al menos parcial de la fibrilación auricular y no lo contrario como es hasta ahora comprendida.⁽³⁾

El endotelio, es una capa lineal de células que recubre la superficie interna de los vasos sanguíneos, las cavidades y las válvulas cardíacas. Es capaz de detectar una amplia gama de estímulos físicos y químicos y libera una numerosa cantidad de moléculas mensajeras que regulan la vasorreactividad, la inflamación, la trombosis y la mitogénesis. ^(3,4)

La enfermedad de la válvula mitral tiene una importante prevalencia en nuestra población, esta se ve afectada por diversas entidades como lo son la fiebre reumática, la enfermedad degenerativa y la cardiopatía isquémica, la miocardiopatía dilatada, entre otras.

La arritmia más frecuente en los pacientes con enfermedad mitral es la fibrilación auricular, sin embargo, aun no se sabe porque en algunos pacientes esta se presenta tempranamente en el curso de la enfermedad mitral y en otros en forma más tardía.

Recientemente se ha asociado la enfermedad mitral con trastornos de la función endotelial y con un aumento en la actividad oxidativa en la aurícula izquierda, hallazgos que apoyan el novedoso concepto de que la disfunción endotelial participa como mecanismo desencadenante de la fibrilación auricular.

El aumento en la actividad oxidativa en la aurícula izquierda es conocido por causar múltiples alteraciones en la función de esta. El estrés oxidativo disminuye o interrumpe la producción de óxido nítrico (ON) en la aurícula izquierda, el cual es un compuesto con una actividad biológica muy importante en el sistema vascular. Al mismo tiempo, se sabe que la fibrilación auricular induce inflamación endotelial con elevación de la proteína C reactiva y producción de citosinas, lo que contribuye a sostener la arritmia y a la creación de un estado protrombótico.⁽¹⁰⁾

Las células endoteliales responden a diferentes estímulos, como la presión sanguínea, la hipoxia y a la presencia de radicales libres. Los radicales libres participan en diversas funciones biológicas, por ejemplo activando a las proteínas AP-1 y AP-2 que modulan la proliferación celular y la morfogénesis. Aunado a lo anterior se sabe que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son capaces de modular las PKC (proteína cinasa C) que influyen en el crecimiento celular, activación de citocinas y en la angiogénesis, procesos que cuando se intensifican dan origen a diferentes patologías relacionadas con el lecho vascular como son la aterogénesis e hipertensión. Esto se debe a que los radicales de oxígeno actúan aumentando la expresión de endotelina-1 (ET-1), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Como ejemplo de patologías que están relacionadas con la disfunción endotelial y el estrés oxidativo se encuentra el síndrome metabólico y la diabetes, estas son patologías que se caracterizan por presentar niveles elevados del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) teniendo como consecuencia el incremento de especies reactivas de oxígeno y la presencia de aterosclerosis acelerada. En este mismo sentido se ha identificado que en la enfermedad coronaria están elevados los niveles de NAD(P)H oxidasa, una fuente de especies reactivas de oxígeno.

Se encontrado también la relación entre la tensión arterial elevada y la presencia incrementada de radicales libres, los cuales se sabe que participan en la fisiopatología de la hipertensión inhibiendo la producción del óxido nítrico en el endotelio.

Es indudable que tanto las ROS como las de nitrógeno (RNS) están asociadas con el daño encontrado en las paredes vasculares, existiendo a la fecha controversia en si son origen o consecuencia de las patologías, ya que existen datos experimentales que soportan ambas teorías, independientemente de eso, las principales fuentes de producción de oxidantes en la pared vascular son :

- 1) NAD(P)H oxidasas (Nox).
Neutrófilos, monocitos, macrófagos, fibroblastos de la adventicia, células de músculo liso vascular y células endoteliales contienen enzimas NAD(P)H oxidasas asociadas a la membrana plasmática, estas enzimas utilizan NADH o NAD(P)H como donadores de electrones para generar superóxido.
- 2) Xantina oxidasa.
Esta enzima utiliza xantina o hipoxantina para originar ácido úrico, existe en dos formas a) Deshidrogenada, que origina NADH y b) Oxidada que genera superóxido.
- 3) Sintasa de óxido nítrico (NOS).
NOS endotelial es un homodímero, cada monómero está constituido por un dominio de reductasa (con sitios de enlace para NADPH, FAD y FMN) y por un dominio oxigenasa (conteniendo Zn, tetrahidrobiopterina, hemo y L-arginina) que están unidas por una región a la que se enlaza la calmodulina. En ausencia de cofactores, tales como la tetrahidrobiopterina eNOS puede desacoplarse y reducir oxígeno molecular en lugar de transferir electrones a la arginina y por esta razón generando superóxido.¹¹
- 4) Mieloperoxidasa.
Esta es una hemoenzima que cataliza la conversión de Cl⁻a ácido hipocloroso (HOCl), el

sistema puede originar 3 clorotirosina, clorohidrinas de colesterol y ácidos grasos y radicales tirosilos que pueden participar en la oxidación secundaria de LDL.

5) Lipooxigenasas.

Son enzimas dioxigenasas que catalizan la inserción estereoespecífica de oxígeno molecular en ácidos grasos poliinsaturados. Doce y 15 lipooxigenasa oxigena ácidos grasos esterificados con colesterol y fosfolípidos, in vitro 15-lipooxigenasa puede oxidar LDL a través de mecanismos enzimáticos directos y de reacciones no enzimáticas indirectas.

6) Respiración mitocondrial.

Como producto lateral del flujo de electrones a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, 1-2% del oxígeno molecular puede ser convertido a superóxido, esto sucede primariamente a nivel complejo I (NADH deshidrogenasa) y del complejo III (ubiquinona-citocromo bc1).

7) Metales de transición.

Metales como fierro y cobre son catalizadores fuertes para reacciones de oxidación en la presencia de hidroperóxidos.

8) Otros oxidantes.

A los radicales lipoperoxilo se les propone como los principales mediadores de lipoperoxidación.

El establecer la participación precisa de las especies reactivas requiere de la habilidad para medirlos, ya sea directamente o mediante la evaluación del daño que causan.

Para estudiar su función, es necesaria la medición de sus concentraciones en líquidos biológicos o en muestras de tejidos, pudiendo emplearse al menos 3 grandes abordajes:

A) Atraparlos y medir la concentración de las moléculas resultantes.

La única técnica que puede evaluar directamente la presencia del radical libre (RL) o especie reactiva (ER) es la resonancia magnética de espín electrónico (RMEE).¹³ Con esta técnica se pueden detectar directamente radicales libres que no han reaccionado, sin embargo, dada su corta vida media esto es impráctico. Para resolver esta problemática se ha implementado el uso de sondas o barredores de radicales.

B) Cuantificar la magnitud del daño producido por las especies reactivas.

Las principales biomoléculas (ADN, lípidos y proteínas) son blanco del ataque de los radicales libres. El análisis del daño oxidativo del ADN es de alta relevancia biológica y se le ha relacionado con el desarrollo de neoplasias y otras patologías asociadas.

La lipoperoxidación da como resultado formación de hidroperóxidos de lípidos altamente reactivos.

Una de las técnicas más utilizada para la cuantificación del daño oxidativo en lípidos es la evaluación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA),¹⁷ sin embargo, dada su inespecificidad, está casi en desuso. Las variaciones más comúnmente utilizadas son la cuantificación del malondialdehído (MDA) y del 4 hidroxinonenal (4-HNE), en la actualidad la cuantificación de los isoprostanos, familia de eicosanoides de origen no enzimático producidos por la oxidación de fosfolípidos por RL de oxígeno, ha adquirido relevancia.

Por otro lado, el ataque oxidante a los aminoácidos constituyentes de las proteínas es un proceso altamente complejo que puede generar a su vez, radicales de aminoácidos, que pueden reaccionar entre sí o con oxígeno para originar radicales peroxilo que a través de la formación de peróxidos dan reacciones en cadena perpetuando el daño. La cuantificación de ditirosinas y 3-nitrotirosina,

ha adquirido recientemente gran relevancia. La cuantificación de carbonilos se emplea también para evaluar daño oxidante en proteínas.

C) Cuantificar la actividad antioxidante.

Otro abordaje para la evaluación de estrés/daño oxidante emplea métodos indirectos, basados en la capacidad alterada del organismo para modular la concentración incrementada de RL o ER. Un enfoque para dicha evaluación compara la actividad de un antioxidante de referencia (trolox) con la actividad antioxidante encontrada en plasma u orina, con esta metodología se evalúan como un todo, las actividades de las enzimas dismutasa de superóxido (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa de glutatión (GSHPOx), de proteínas como: albúmina, ceruloplasmina y ferritina, y de moléculas con capacidad antioxidante tales como ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, glutatión reducido, ácido úrico y bilirrubina.

Un enfoque alternativo analiza por separado la actividad de las enzimas mencionadas y la concentración de glutatión.

La evaluación del daño oxidante está adquiriendo gran relevancia y en un futuro cercano seguramente podrá ser utilizada para el seguimiento de las enfermedades crónicas degenerativas como por ejemplo el síndrome metabólico.

HIPÓTESIS

Los sujetos con enfermedad mitral presentan un aumento en la actividad oxidativa presente en el suero. Dicho aumento puede ser observado independientemente del ritmo cardiaco presente. Los sujetos con enfermedad mitral y fibrilación auricular presentan una mayor actividad oxidativa que los sujetos en ritmo sinusal.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El incremento del estrés oxidativo puede presentarse en pacientes con enfermedad mitral aun sin presentar fibrilación auricular?

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que los pacientes con enfermedad valvular mitral (reumática o crónico-degenerativa) presentan aumento en los marcadores de estrés oxidativo previo a la aparición de la fibrilación auricular.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar que los marcadores de estrés oxidativo pueden ser encontrados de forma incrementada en el suero de pacientes con enfermedad mitral cuando están en ritmo sinusal y en concentraciones crecientes según la progresión del trastorno del ritmo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron pacientes procedentes de la consulta externa, consulta de arritmias y piso de hospitalización con enfermedad mitral (estenosis o insuficiencia) de grado severo. Posteriormente se solicitó ecocardiograma doppler y holter de 24 hrs a cada uno. Con los resultados posteriormente se agruparon los sujetos en 3 grupos + 1 grupo control el cual se formó con sujetos voluntarios, sanos, donadores en el banco de sangre. Los grupos quedaran como sigue:

- 1) Grupo control
 - a. Formado con sujetos voluntarios, sanos, donadores en el banco de sangre, a los cuales se les realiza de rutina interrogatorio, exploración física y exámenes de laboratorio para confirmar su status de “sanos”.
- 2) Pacientes con enfermedad mitral en ritmo sinusal
 - a. Pacientes en los que se confirmó ecocardiográficamente la presencia de enfermedad mitral y mediante holter de ritmo de 24 hrs e interrogatorio con ausencia de síntomas compatibles con fibrilación auricular paroxística se descartó la presencia de esta.
- 3) Pacientes con enfermedad mitral y fibrilación auricular paroxística
 - a. Pacientes en los que se confirmó ecocardiográficamente la presencia de enfermedad mitral y mediante holter de ritmo de 24 hrs, así como anotaciones en el expediente clínico y el interrogatorio se confirmó la presencia de fibrilación auricular paroxística la cual se definió como la presencia de episodios (único o múltiples) de fibrilación auricular con duración menor a 24 hrs.
- 4) Pacientes con enfermedad mitral y fibrilación auricular persistente/permanente
 - a. Pacientes en los que se confirmó ecocardiográficamente la presencia de enfermedad mitral y mediante electrocardiogramas seriados, anotaciones en el expediente clínico y holter de ritmo de 24 hrs se confirmó la presencia persistente/permanente de fibrilación auricular (al menos presente durante 1 mes continuo).

Para fines de nuestro estudio se decidió estudiar la actividad de los siguientes marcadores:

1. Evaluación del sistema enzimático antioxidante a través de la medición de la superóxido dismutasa (SOD)
2. Evaluación de la capacidad antioxidante del sistema no enzimático a través de la medición de la capacidad reductora del cloruro férrico en plasma (FRAP)
3. Lipoperoxidación a través de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

En todos se obtuvo una muestra de 20ml de sangre la cual fue centrifugada para obtener suero y mantenida en congelación a -70°C hasta el momento de su análisis.

Se estudiaron 38 sujetos, divididos en 4 grupos: Grupo 1 (control) 8 sujetos sanos. Grupo 2 (ritmo sinusal) 12 sujetos con enfermedad valvular en ritmo sinusal. Grupo 3 (fibrilación auricular paroxística) 7 sujetos con enfermedad mitral. Grupo 4 (fibrilación auricular persistente/permanente) 11 sujetos con enfermedad mitral.

Una vez completada la selección de pacientes se analizaron las muestras para determinar la presencia de marcadores de estrés oxidativo y se compararon los grupos.

Se utilizó la siguiente metodología de análisis de marcadores:

Evaluación del sistema enzimático antioxidante a través de la medición de la superóxido dismutasa (SOD)

La medición de actividad de enzimas antioxidantes se realizó por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 10%.

Para determinar la actividad de la SOD, el gel se lavó 3 veces con agua destilada por 5 minutos; después se incubó con nitroazul de tetrazolio (NBT) 2.45 mM por 20 minutos; al terminar se decantó la solución de NBT y se incubó el gel en una solución buffer de EDTA 28 mM, riboflavina 0.028 mM, y fosfato 36 mM con pH 7.8. Después de 15 minutos de incubación en la obscuridad, se utilizó la exposición a luz UV para revelar la marca de NBT para O₂. Los geles se analizaron por densitometría con el analizador de imagen Sigma Scan Pro 5.

Lipoperoxidación a través de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Se midió TBARS, un marcador de daño por radicales libres, por medio de un método estándar. A 100 µL de muestra de plasma, se agregaron 50 µL de metanol con BHT al 4% más un buffer de fosfato con pH de 7.4. Se agitó la muestra vigorosamente en vórtex por 5 segundos y posteriormente se incubó en un baño de agua a 37°C por 30 minutos. Se continuó con la adición de 1 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.8% y 1 mL de ácido acético al 20% con pH de 2.5 y se incubó en baño de agua a temperatura de ebullición por 1 hora.

Después de este tiempo y para detener la reacción, se extrajeron las muestras para colocarlas en hielo; se agregaron 500 µL de NaCl al 0.9% así como 4 mL de L-Butanol a cada una de ellas; se agitaron en vórtex por 30 segundos y se centrifugaron a 2000 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos. Después se extrajo la fase de L-Butanol y se midió la absorbancia a 532 nm. La curva de calibración se obtuvo utilizando tetraetoxipropano como medida estándar.

Evaluación de la capacidad antioxidante del sistema no enzimático a través de la medición de la capacidad reductora del cloruro férrico en plasma (FRAP)

Se suspendieron 50 µL de muestra de suero en 1.5 mL de mezcla de reacción (buffer de acetato 300 mM pH 3.6, cloruro férrico hexahidratado 20 mM y 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina 10 mM disuelto en ácido clorhídrico 40 mM en una relación 10 : 1 : 1 v/v, resp.). Se agitó la mezcla vigorosamente en vórtex por 5 segundos. Posteriormente se incubó a 37°C por 20 minutos en la obscuridad. Se midió la absorbancia a 593 nm. La curva de calibración se obtuvo utilizando el equivalente de Trolox µmol.

A los sujetos en el grupo 1 al 100% se les realizó la prueba de SOD, al 100% la prueba de FRAP y al 100% Tbars. A los sujetos del grupo 2 al 58% se les realizó la prueba de SOD, al 100% la prueba de FRAP y al 58% la prueba de Tbars. A los sujetos del grupo 3 al 100% se le realizó la prueba de

SOD, al 100% la prueba de FRAP y al 100% la prueba de Tbars. A los sujetos del grupo 4 al 100% se le realizo la prueba de SOD, al 82% la prueba de FRAP y al 100% la prueba de Tbars.

DEFINICIÓN DE VARIABLES

➤ Demográficas

- Hipertensión Arterial Sistémica
 - Con diagnóstico previo en el expediente electrónico
- Diabetes Mellitus
 - Con diagnóstico previo en el expediente electrónico
- Síndrome de Marfan
 - Con diagnóstico previo en el expediente electrónico
- Insuficiencia Mitral Pura
 - Con insuficiencia mitral de grado severo en ausencia de gradiente transmitral medio >5mm/Hg
- Estenosis Mitral Pura
 - Con gradiente transmitral medio >10mm/Hg en ausencia de insuficiencia mitral mayor a leve
- Doble Lesión Mitral
 - Con insuficiencia mitral severa en asociación con gradiente transmitral medio > 5mm/Hg

➤ Operacionales

- Independientes
 - Ritmo Cardíaco (Variable Nominal)
 - Sinusal
 - Consignado en el expediente electrónico en la anotación mas reciente
 - Fibrilación Auricular Paroxística
 - Consignado en el expediente electrónico en la anotación mas reciente y sustentado en electrocardiograma o holter de 24 hrs
 - Fibrilación Auricular Persistente/Permanente
 - Consignado en el expediente electrónico en la anotación mas reciente y sustentado en electrocardiograma o holter de 24 hrs
- Dependientes
 - Actividad de Peroxidación Lipídica
 - Prueba de TBARS (reportado en unidades por mililitro)
 - Capacidad Antioxidante
 - Actividad de la Superóxido Dismutasa (reportado en unidades por mililitro)
 - Capacidad de Reducción Férrica del Plasma
 - Prueba de FRAP (reportado en unidades por mililitro)

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- ⊙ Enfermos con valvulopatía mitral (estenosis, regurgitación doble lesión) de origen reumático, crónico-degenerativo, congénito, traumático, etc.)
- ⊙ Atendidos en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
- ⊙ Todos los pacientes con enfermedad mitral documentada por ecocardiograma transtorácico doppler.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes con:

- ⊙ Enfermedades Inflamatorias
- ⊙ Enfermedades Infecciosas
- ⊙ Enfermedades Hepáticas
- ⊙ Enfermedades Malignas
- ⊙ Uso de antiinflamatorios no esteroideos, folatos o vitaminas antioxidantes
- ⊙ Uso de antiarrítmicos que no sean betabloqueadores

DISEÑO DEL ESTUDIO, TAMAÑO DE LA MUESTRA Y ANALISIS ESTADISTICO

Se trata de un estudio observacional, transversal, comparativo.

Para el tamaño de muestra fue necesario analizar estudios realizados en pacientes con enfermedades infecciosas e isquémicas. Se determinó que el marcador mas importante y con mayor oportunidad de mostrar un aumento significativo era la capacidad antioxidante de la superóxido dismutasa (SOD). Encontramos en otros estudios niveles basales tan bajos como 5.82 U/ml y tan altos como 51.30 U/ml variando según las características de la población estudiada. Se reportan aumentos tan importantes como hasta 73,039 U/ml en un estudio con pacientes sépticos. En pacientes con síndromes coronarios agudos se muestran cifras máximas de hasta 150U/ml y basales de 61.62U/ml, tomando estos últimos valores como la base de nuestro cálculo.

$$\odot \frac{68^2 + 24.71^2 \times (1.96 + .84)^2}{(150 - 61.62)^2} = 6.82 \text{ sujetos por grupo}$$

Por tratarse de grupos pequeños se asumió la no normalidad en la distribución de los datos, por lo tanto se reporta mediana y rango intercuartil de los grupos.

Las variables analizadas fueron cuantitativas continuas por lo tanto para analizar la diferencia entre grupos se uso la prueba de Kruskal-Wallis y para el análisis entre 2 grupos se utilizo la prueba de Mann-Whitney.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa estadístico SPSS v17.

Se aceptó como significativo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se reclutaron un total de 30 pacientes con enfermedad mitral severa, de los cuales 12 estaban en ritmo sinusal, 7 con fibrilación auricular paroxística y 11 en ritmo de fibrilación auricular permanente. Así mismo se analizaron 8 sujetos sanos como grupo control.

Tabla 1 Características Demográficas

	Control	Sinusal	FA Paroxística	FA Permanente
HAS	0/8 (0%)	6/12 (50%)	1/7 (14.3%)	3/11 (27.3%)
Dislipiedemia	0/8 (0%)	6/12 (50%)	1/7 (14.3%)	2/11 (18.2%)
Diabetes	0/8 (0%)	0/12 (0%)	0/7 (0%)	1/11 (9.1%)
Marfan	0/8 (0%)	0/12 (0%)	1/7 (14.3%)	0/11 (0%)
Insuficiencia Mitral	0/8 (0%)	2/12 (16.6%)	2/7 (28.6%)	3/11 (27.3%)
Estenosis Mitral	0/8 (0%)	3/12 (25%)	3/7 (42.9%)	4/11 (36.4%)
Doble Lesión Mitral	0/8 (0%)	7/12 (58.3%)	2/7 (28.6%)	4/11 (36.4%)

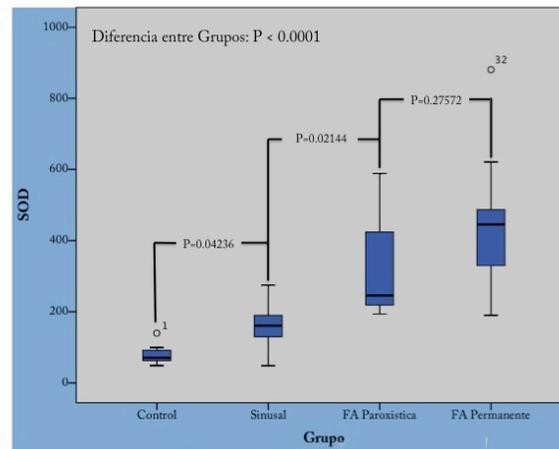
En la Tabla 1 se muestra que los sujetos de los diferentes grupos con excepción del grupo control presentaban características similares. Solo un sujeto era portador de diabetes mellitus y de los sujetos portadores de dislipidemia, se trataba de casos leves en los que hasta el momento no había sido necesario el tratamiento con estatinas.

Tabla 2 Concentración de marcadores de estrés oxidativo

Grupo	Sexo	Edad	SOD (U/ml)	TBARS (U/ml)	FRAP (U/ml)
Grupo 1	H	42	139.94	203.17	235.80
Grupo 1	F	38	83.88	188.76	275.86
Grupo 1	H	21	58.50	70.65	136.12
Grupo 1	F	26	67.72	105.26	201.43
Grupo 1	H	33	69.61	208.50	178.78
Grupo 1	F	48	48.60	224.96	198.13
Grupo 1	F	64	100.10	183.81	210.20
Grupo 1	H	56	72.30	208.50	234.02
Grupo 2	F	54	48.30	391.23	319.56
Grupo 2	F	56	159.84	309.23	369.22
Grupo 2	F	51	99.42	653.33	278.24
Grupo 2	H	38	209.91	583.93	286.14
Grupo 2	F	49	161.05	374.23	289.09
Grupo 2	H	34	170.04	391.63	289.66
Grupo 2	F	67	275.16	450.09	273.12
Grupo 2	F	36	ND	ND	342.13
Grupo 2	H	42	ND	ND	241.70
Grupo 2	H	50	ND	ND	191.01
Grupo 2	H	32	ND	ND	514.69
Grupo 2	F	47	ND	ND	502.61
Grupo 3	F	68	193.76	1023.33	337.05
Grupo 3	H	32	201.34	591.19	465.70
Grupo 3	F	45	360.45	2103.68	368.65
Grupo 3	H	42	245.86	1599.52	350.60
Grupo 3	H	56	588.88	119.67	341.65
Grupo 3	H	68	488.01	145.63	356.63
Grupo 3	F	71	236.73	315.49	905.72
Grupo 4	F	65	445.65	2463.79	375.99
Grupo 4	H	50	464.41	1599.52	381.63
Grupo 4	H	64	460.37	951.31	434.67
Grupo 4	F	77	190.12	519.17	465.70
Grupo 4	F	65	620.99	1500.99	720.60
Grupo 4	H	61	509.39	1807.30	576.08
Grupo 4	F	26	443.22	2089.20	460.55
Grupo 4	F	61	414.54	602.30	454.27
Grupo 4	H	51	232.63	802.20	556.26
Grupo 4	H	58	880.89	982.10	ND
Grupo 4	F	36	245.93	2740.00	ND

En la tabla 2 se muestran las concentraciones halladas en cada sujeto de cada marcador de actividad oxidativa divididos por grupo.

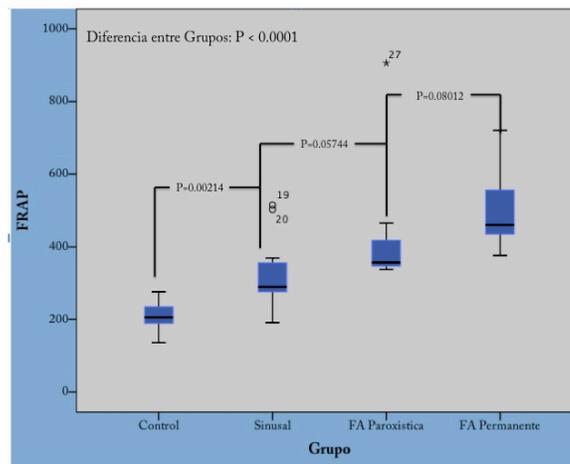
Figura 1



Diferencia entre la actividad plasmática de Superóxido Dismutasa en los diferentes grupos.

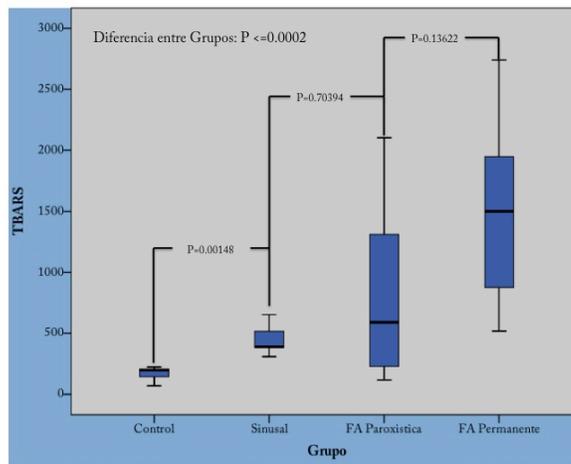
En la **figura 1** podemos observar que se demuestra un patrón creciente de la actividad de la superóxido dismutasa en relación a la progresión de la arritmia, es decir, se observa elevación del estrés oxidativo aun sin la presencia de fibrilación auricular pero este aumenta según progresa en los pacientes la fibrilación auricular a paroxística y posteriormente a permanente.

Figura 2



En la **figura 2** se observa como la capacidad reductora del cloruro férrico en plasma (FRAP) muestra una diferencia significativa entre los controles y los sujetos con enfermedad mitral. Así mismo se observa una diferencia significativa marginal entre los pacientes en ritmo sinusal Vs aquellos con fibrilación auricular paroxística, no así en estos últimos Vs los pacientes en fibrilación auricular permanente.

Figura 3



En la **figura 3** vemos como la lipoperoxidación a través de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) muestra también una actividad incrementada en los sujetos con enfermedad mitral con respecto a controles sanos, no así al comparar a los sujetos enfermos entre sí.

En las figuras anteriores se puede observar como se muestra una diferencia entre la actividad oxidativa entre los controles y el resto de los grupos. Así mismo se muestra la tendencia creciente de la actividad oxidativa conforme progresa la arritmia sin embargo se observa un estrés incrementado desde el momento que se diagnostica la enfermedad valvular independientemente del ritmo cardíaco encontrado.

DISCUSIÓN

La disfunción endotelial / estrés oxidativo y la fibrilación auricular comparten muchos factores de riesgo, como la hipertensión arterial, la diabetes, la dislipidemia y el tabaquismo, de tal manera que sería aceptable suponer que la disfunción endotelial / estrés oxidativo pudiera estar presente antes de la aparición de la arritmia. Hasta la fecha no se cuenta con estudios de cohorte prospectivos para analizar relación causa-efecto entre ambos. (2)

Actualmente es bien conocido que la disfunción endotelial aumenta el estrés oxidativo, la presencia de agentes proinflamatorios y altera la vasorelajación dependiente de óxido nítrico (10).

Reciente evidencia señala que el estrés oxidativo se encuentra asociado al desarrollo de la FA, esto, a la luz de recientes estudios experimentales que han confirmado que los cambios en el estado de óxido-reducción pueden afectar las propiedades de los canales de iónicos celulares así como la actividad de los transportadores de dichos iones.

Los hallazgos observados en el presente estudio están de acuerdo con reportes en la literatura reciente en los que se cuestiona la relación entre la disfunción endotelial / estrés oxidativo y la fibrilación auricular.

El haber demostrado que en pacientes que muy frecuentemente desarrollan fibrilación auricular, la actividad oxidativa se encuentra incrementada aun cuando no han desarrollado la arritmia es evidencia suficiente para sostener que la fibrilación no es la causa del incremento en la actividad oxidativa.

Las implicaciones de los hallazgos de este estudio son muchas, principalmente en torno al tratamiento de la fibrilación auricular y en la prevención de su complicación mas temible; el tromboembolismo sistémico, y es que este último se ha asociado directamente con la actividad oxidativa y probablemente atacando directamente en esta pudiéramos disminuir la incidencia de tan devastador suceso.

Vale la pena comentar las limitaciones de este estudio en torno al tamaño de muestra y al no haber podido controlar variables como hipertensión arterial y diabetes mellitus las cuales sin duda tienen un efecto en la presencia de marcadores de estrés oxidativo.

CONCLUSIONES

Con base en los datos observados es posible sostener la hipótesis inicial argumentando que según los resultados obtenidos en este estudio los pacientes con enfermedad mitral tienen un incremento en el estrés oxidativo independientemente de si su ritmo cardiaco es o no de fibrilación auricular, de tal manera que podemos afirmar que no es la fibrilación auricular la responsable del incremento de la actividad oxidativa. Por lo tanto incluso se puede especular que la fibrilación auricular es consecuencia, al menos parcial de la actividad oxidativa incrementada, sobre esto ya hay varios trabajos que demuestran que el estrés oxidativo juega un papel determinante en la fibrosis cardiaca, substrato fundamental en la génesis de la fibrilación auricular.

Consideramos por tanto, que en el futuro se deberán realizar estudios en de cohorte prospectiva para que una vez controlando las variables, identificar la probable relación causal entre el estrés oxidativo y la fibrilación auricular. Lo anterior podría abrir la puerta para el entendimiento de las complicaciones de dicha arritmia, particularmente el tromboembolismo sistémico y quizá dar pie a nuevas terapias enfocadas al control del estrés oxidativo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Krahn AD, Manfreda J, Tate RB, et al. The natural history of atrial fibrillation: incidence, risk factors, and prognosis in the Manitoba Follow-Up Study. *Am J Med* 1995; 98:476.
2. Kannel WB, Abbott RD, Savage DD, McNamara PM. Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study. *N Engl J Med* 1982; 306:1018.
3. Verma S, Anderson TJ: Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002;105:546-549.
4. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ: Endothelial function and dysfunction. Testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285- 1295
5. Atrial endocardial changes in mitral valve disease: a scanning electron microscopy study. Kumar P. *Am Heart J*. 2000 Nov;140(5):777-84.
6. Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP, et al. Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2004; 110:1042.
7. Matsue Y, Suzuki M, Abe M, Ono M Endothelial dysfunction in paroxysmal atrial fibrillation as a prothrombotic state. Comparison with permanent/persistent atrial fibrillation. *Circulation* 2008; 110:1052.
8. E, Aydogdu S, Ozdemir M, Kural T Prevalence and predictors of atrial fibrillation in rheumatic valvular heart disease. *Am J Cardiol*. 1996;77(1):96.9
9. Raviele A, Ronco F.J Endothelial dysfunction in Atrial Fibrillation: What is the relationship ? *Cardiovasc Electrophysiol*. 2011 Apr; 22 (4):383-4. doi: 10.1111/j.1540-8167.2010.01954.x. Epub 2010 Nov 18
10. Mikhail S. Dzeshka, MD*,†; Gregory Y.H. Lip, MD*,‡; Viktor Snezhitskiy, PhD. Cardiac Fibrosis in Patients With Atrial Fibrillation; Mechanisms and Clinical Implications. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(8):943-959. doi:10.1016/j.jacc.2015.06.1313