



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

División de Estudios de Posgrado

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"  
Servicio de Cirugía Cardiotorácica



# Alteraciones de las enzimas que emplean el Glutación en el tejido aórtico de pacientes con síndrome de Marfan

---

Tesis para obtener el título de:

**Especialista en Cirugía Cardiotorácica**

Presenta:

*Dr. Elías Harold Núñez Garrido*

Tutor:

*Dr. Israel Pérez Torres*

*Investigador en Ciencias Médicas "C" SIN I*

*Dr. Valentín Herrera*

*Jefe de Servicios de Cirugía Cardiotorácica*

*Dra. María Elena Soto López*

*Investigador en Ciencias Médicas "D" SNI II*

MÉXICO, D.F.

AGOSTO DE 2014.



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.



---

Dr. José Fernando Guadalajara Boo

Director de enseñanza

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

---

# Agradecimientos

Quiero agradecer a mis Hijos Esteban y Rosalía por todo el apoyo que me han dado, para lograr mis sueños de ser Cirujano Cardiotorácico.

---

Al Dr. Valentín Herrera quien me ha enseñado todo lo que debo conocer y hacer Profesionalmente para continuar con una carrera de servicio y entrega en esta Especialidad, así como reconocer que El ha sido un modelo de vida a seguir ya que me ha enseñado a conocer cuáles son los objetivos para el mejor desempeño de este trabajo y además le tengo que reconocer y admirar su fortaleza en la vida para lograr metas tan importantes como las que él se ha fijado y alcanzado.

A Dr. Barragán agradecer su interés por enseñar, su experiencia y limitaciones durante su práctica diaria Profesional, lo cual nos permite formar un criterio real en las decisiones que se tienen que tomar durante la práctica quirúrgica.

A los Doctores, Dr. López- Soriano, Dr. Ramírez, Dr. Soulé, Dr. Humberto Martínez, Dr. Cervantes, Dr. Jorge Catrip, Dr. Mario Gómez y Dr. Iván Hernández. Les agradezco recibirme en su casa con los brazos abiertos y de todos he recibido la enseñanza oportuna y cada uno en sus facetas he aprendido las virtudes y excelencias que espero alcanzar.

Al Dr. Juárez gracias por sus prácticas de laboratorio quirúrgico y su afable tratamiento y desinteresada Enseñanza.

A mis compañeros de Batalla: Muruato, Alan, Guillermo, Marlo, Cecilio, Mauricio, Iván, James, Javier, Sagahón, Miguel, Julius, Valeria, Mar, Octavio, María René, Damián, Dagoberto, Myrlene, Víctor, Adolfo, Laura, Karla y Rosa para ellos guerreros en el que todos nos apoyamos en la lucha de alcanzar el sueño para ser Cirujanos Cardiacos y les deseo a todos que lo logren.

A la Dra. Soto y al Dr. Israel, por haberme guiado ahora en el final de mi Carrera en este proceso de aprendizaje en Investigación para elaborar la Tesis y el proceso necesario para la elaboración del Artículo y sobre todo enseñarme un poquito el complejo mundo de la Investigación.

A la Dra. Alejandra, un agradecimiento desinteresado por apoyarme en este proyecto cuando nadie quería realizar el arduo esfuerzo de manejar el estudio del estrés oxidante en el laboratorio y por ser un modelo de investigadora joven con un futuro predicablemente exitoso.

Dios sabe que en mi corazón El esta primero en todo mi agradecimiento porque sin su favor nada hubiera concluido, sin El no se hubieran dado todos los factores necesarios para que fuera concluida esta meta.

---

# Contenido

---

Glosario

Resumen

Introducción

Antecedentes

Problema y justificación

Pregunta de investigación

Objetivos

Hipótesis

Diseño

Material y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusión

Referencias bibliográficas

Anexos

# Glosario

---

## Definiciones

- Aneurisma aórtico: dilatación de la aorta. Es una enfermedad grave, se considera que hay aneurisma aórtico si se ha dilatado 1,5 veces su tamaño normal <sup>1</sup>.
- Disección de aorta: desgarro en la pared de la arteria aorta que hace que la sangre fluya entre sus capas (intima, media y adventicia) y provoca la separación de las mismas <sup>2</sup>.
- Cirugía de Bentall y De Bono: técnica usada en casos de aneurismas aórticos con ectasia valvular, consiste en la sustitución de la válvula aórtica y la aorta ascendente por una prótesis compuesta con válvula mecánica, se sutura en bloque al anillo aórtico y se anastomosan las coronarias a la prótesis <sup>3</sup>.
- Cirugía de Tirone-David: técnicas que permiten preservar la válvula en pacientes con aneurisma de raíz aórtica, se coloca una prótesis y se resuspende la válvula nativa <sup>4</sup>.
- Cirugía de Yacoub: técnica que permite la preservación de la función del anillo aórtico además de formar los neosenos. <sup>5</sup>.
- Glutación (GSH): tripéptido compuesto por ácido glutámico, cisteína y glicina. Que ayudan a proteger las células de especies reactivas de oxígeno (ERO), es el mayor antioxidante endógeno, pues por si solo es un inhibidor de los radicales  $\text{OH}^-$  (hidroxilo) y  $\text{O}_2^-$  (anión superóxido) <sup>6</sup>.
- Lipoperoxidación: Es el proceso a través del cual las ERO oxidan los lípidos de las membranas celulares <sup>7</sup>.
- Capacidad antioxidante del sistema no enzimático FRAP (siglas en inglés): Reducción férrica / poder antioxidante, técnica que permite evaluar la capacidad antioxidante del sistema no enzimático celular <sup>8</sup>.
- Glutación peroxidasa (GPx): enzima antioxidante que cataliza la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al oxidar el GSH a GSSG <sup>9</sup>.
- Glutación reductasa (GSSG-R): enzima que cataliza la reducción del GSSG a GSH <sup>10</sup>.
- Glutación-S-transferasa (GST): enzima involucrada en el metabolismo de los xenobióticos y en la protección del daño causado por peróxidos, al oxidar el GSH a GSSG <sup>11</sup>.

# Resumen

---

El Síndrome de Marfan (SM) cursa con dilatación aórtica progresiva y disección aguda temprana asociada a disfunción endotelial y estrés oxidante, que se complica con ruptura inminente y muerte súbita. En una cohorte de 14 sujetos con SM se evaluó la actividad de las enzimas que emplean el glutatión en el tejido del aneurisma aórtico en comparación a un grupo de 3 pacientes sin SM sometidos a cirugía torácica. En los pacientes con SM se suspendieron AINES, estatinas y clopidogrel previo a la cirugía donde se obtuvo el tejido aórtico. En el homogeneizado de aorta, se determinó por espectrofotometría: el índice de lipoperoxidación, el FRAP, la concentración de GSH y GSSG, la actividad de las enzimas GPx, GST y GSSG-R. Se encontró que en los pacientes con SM: el índice de lipoperoxidación estaba incrementado, mientras que el FRAP, el índice GSH/GSSG, la actividad de las enzimas GPx estaban disminuidos de forma significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación a los pacientes control. La actividad de las enzimas GST y GSSG-R presentó tendencia a disminuir e incrementar respectivamente. En conclusión las alteraciones en la actividad de las enzimas que emplean el GSH están relacionadas a cambios estructurales y funcionales en la aorta torácica de los pacientes con SM y asociadas a una disminución en la capacidad antioxidante y la presencia de lipoperoxidación.

# Introducción

---

El Síndrome de Marfan (SM) es una enfermedad ocasionada por la mutación del gen codificador de fibrilina 1 (FBN-1) de presentación clínica variable que afecta el tejido conectivo del sistema cardiovascular, óptico y esquelético. El SM produce necrosis de la lámina media vascular, caracterizada por la dilatación progresiva de la arteria aorta torácica sin síntomas previos a la presencia de aneurismas, en la mayoría de los casos los síntomas se inician en el momento de la disección aguda temprana y/o ruptura inminente de esta arteria lo que conlleva en ocasiones a muerte súbita<sup>12-15</sup>.

Se ha comprobado que la progresión de los aneurismas aórticos en el segmento torácico está asociada a la disfunción endotelial por baja disponibilidad del óxido nítrico (NO), esto favorece el deterioro vasomotor de la arteria<sup>16</sup>. Asimismo, se ha sugerido que las especies reactivas de oxígeno (ERO) son otro de los factores que contribuyen a la degeneración de la pared arterial y a la baja disponibilidad del NO<sup>17</sup>. En relación a esto, se ha reportado que en el suero de pacientes con SM la carbonilación esta incrementada y la capacidad antioxidante total esta disminuida<sup>9</sup>. Soto M.E. y colaboradores evaluaron la participación del estrés oxidante en diferentes aortopatías entre las cuales se incluyó el SM, en este trabajo se encontró que los pacientes con SM el índice de lipoperoxidación, y la expresión de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) estaban incrementados en comparación al grupo control, mientras que la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión-S-transferasa (GST) estaba disminuida al igual que la expresión de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS), lo que sugiere que independientemente al tipo de mecanismo de daño propuesto para la formación de aneurismas en el SM, existe participación del estrés oxidante<sup>18</sup>.

Por lo tanto, en este trabajo se abordó el estudio de la actividad de las enzimas que emplean el glutatión con la finalidad de conocer su posible participación en el daño y formación de aneurismas mediadas por el estrés oxidante en los pacientes con SM.



# Antecedentes

---

## SINDROME DE MARFAN

El SM es un trastorno hereditario del tejido conectivo autosómico dominante causado por la mutación del gen fibrilina 1 (FBN-1) localizado en el cromosoma 15, la prevalencia estimada es de 1 por cada 3.000-10.000 nacidos vivos <sup>19</sup>.

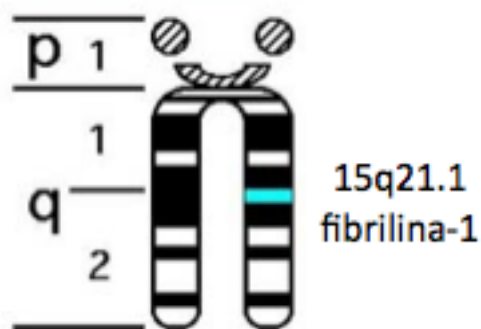


fig.1 <sup>20</sup>.

Este gen codifica para la proteína fibrilina 1 que es un componente abundante de la matriz extracelular <sup>21</sup>.

Se conocen más de 800 mutaciones de este gen, por lo que el diagnóstico es más clínico que genómico. La debilidad del tejido conectivo es debida a un defecto de la proteína fibrilina 1, lo que conduce a las manifestaciones clínicas, manifestaciones que pueden ser oculares, esqueléticas, dérmicas y cardiovasculares, estas últimas con la mayor mortalidad.

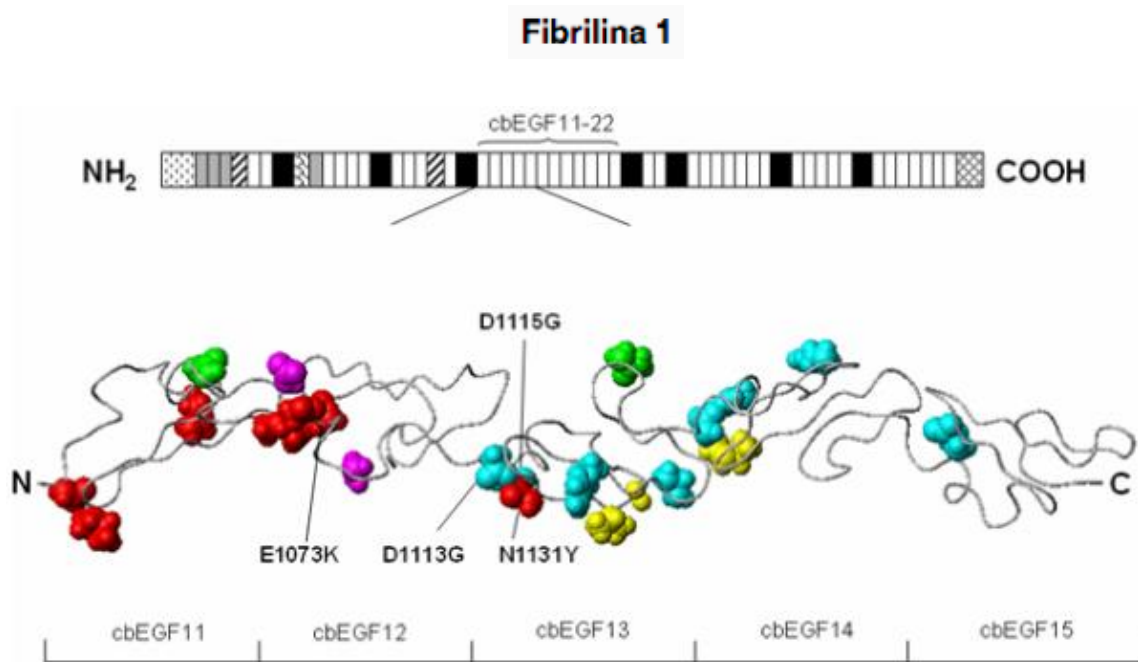


fig. 2 <sup>22</sup>.

Recientemente, surgieron evidencias sobre el papel del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), <sup>23</sup> el cual altera la vía de señalización y participa en la patogénesis del SM. Se conoce que la matriz extracelular regula la activación y biodisponibilidad del TGF- $\beta$  debido a que existe un defecto o deficiencia de fibrilina-1. y la matriz extracelular produce mayor liberación y activación de TGF- $\beta$ . Además se ha descrito que el Smad-dependiente y el ERK dependiente no canónico de la vía de señalización de TGF- $\beta$  contribuyen al desarrollo de aneurismas de la raíz aortica en modelos de ratón del SM <sup>23,24</sup>.

## DIAGNÓSTICO

La enfermedad se presenta típicamente con dilatación aórtica progresiva asociada con incompetencia de la valvula aórtica, prolapso e incompetencia de la válvula mitral, dislocación lenticular y miopía, y un cuerpo alto y delgado. El diagnóstico se basa en la nosología de Ghent como se muestra en la cuadro siguiente <sup>25</sup>.

Cuadro 1.

Órgano/Sistema	Requisitos para la clasificación de criterio mayor	Requisitos para la afectación de órgano/sistema
Esquelético	Al menos cuatro de los siguientes:1. <i>Pectus carinatum</i> 2. <i>Pectus excavatum</i> que requiere cirugía3. Ratio entre segmentos reducido o ratio envergadura y estatura elevado (<1,05)4. Signos del pulgar y muñeca positivos5. Escoliosis (20°) o espondilolistesis6. Extensión del codo reducida (<170°)7. Desplazamiento medial del maléolo interno causando pie plano8. Protrusión acetabular	Al menos dos hallazgos para criterio mayor, o una de esa lista y dos de los siguientes criterios menores:1. <i>Pectus excavatum</i> de moderada severidad2. Hiperlaxitud articular3. Paladar con arco pronunciado o aglomeración dental4. Apariencia facial característica (dolicocefalia, hipoplasia malar, enoftalmos, retrognatía, fisura palpebral baja)
Ocular	Ectopia lentis	Al menos dos de los siguientes criterios menores:1. Cornea anormalmente aplanada2. Aumento de la longitud axial del globo ocular3. Hipoplasia del iris o de músculo ciliar, provocando miosis reducida
Cardiovascular	Al menos uno de los siguientes:1. Dilatación de la aorta ascendente con o sin regurgitación, afectando a los senos de Valsalva2. Disección de la aorta ascendente	Al menos uno de los siguientes criterios menores:1. Prolapso de la válvula mitral, con o sin regurgitación2. Dilatación de la arteria pulmonar, en ausencia de estenosis u otra causa en individuos menores de 40 años3. Calcificación del anillo mitral en menores de 40 años4. Dilatación o disección de la aorta torácica descendente o abdominal en menores de 50 años
Pulmonar	Ninguno	Al menos uno de los siguientes criterios menores:1. Neumotórax espontáneo2. Bullas apicales
Tegumentos	Ninguno	Al menos uno de los siguientes criterios menores:1. Estrías marcadas en ausencia de variaciones ponderales importantes, embarazo o estrés repetido2. Hernia recurrente o incisional
Dura	Ectasia dural lumbosacra	Ninguna

Para el diagnóstico de síndrome de Marfan en pacientes sin antecedentes familiares de enfermedad deben, estar involucrados dos órganos/sistemas que reúnan criterios mayores y al menos la afectación de un tercer órganos/sistemas. En paciente con historia familiar de síndrome de Marfan solo se requiere un criterio mayor, con datos que sugieran afectación de un segundo sistema (tomado de De Paepe A et Al.) 26.

Los pacientes presentan como síntoma principal, dolor torácico intenso, cambios hemodinámicos entre otros, asimismo el diagnóstico se concluye por imagen en donde si el paciente tiene la oportunidad de llegar a un servicio de urgencia se le pueda realizar resonancia magnética o angiotomografía, los cuales son estudios de vanguardia y miden los diámetros de: anillo valvular aórtico, unión seno tubular, aorta ascendente, aorta descendente, y aorta supra diafragmática e infra diafragmática.

La terapia médica actual está enfocada en la prevención para evitar que el paciente culmine en disección aórtica, para lo cual la vigilancia médica periódica, mediante el uso de herramientas no invasivas de imagen permiten evaluar el incremento del diámetro aórtico en el seguimiento de estos pacientes y son recientemente utilizadas.

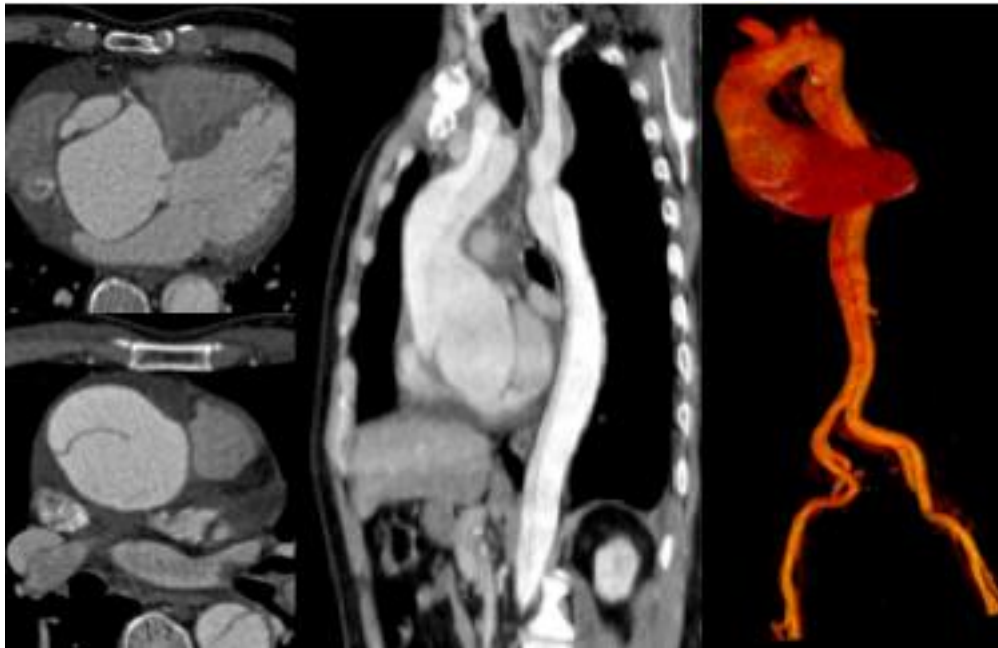


fig. 3. Aneurisma disecado de aorta ascendente (tomado de J Parada et al.) 27 .

### **DISECCIÓN AÓRTICA**

Desgarro en la pared de la arteria aorta que hace que la sangre fluya entre sus capas (intima, media y adventicia) y provoca la separación de las mismas <sup>2</sup>. Altamente letal con un rango de mortalidad entre 1-2% por hora después de establecerse los síntomas <sup>28</sup>.

La verdadera incidencia de disección aórtica es difícil de obtener por 2 razones principales: 1) la disección aórtica puede ser rápidamente fatal, y cuando el paciente muere previo a la hospitalización, la muerte puede ser erróneamente atribuida a otra causa. 2) la disección aórtica aguda, es frecuentemente mal diagnosticada en su presentación inicial y la mortalidad temprana en este grupo puede ser mal clasificada. Estudios de base-poblacional sugieren que la incidencia es de 5 a 30 por 1 millón de personas-año. El 40% de los pacientes con disección aórtica muere antes de llegar a

recibir cuidados de emergencia, mientras que el 5% a 20% muere en el posoperatorio inmediato, finalmente el 50% a 70% se encontrará vivo a 5 años luego de la cirugía<sup>28</sup>.

La disección aguda tipo A, el manejo médico sólo, está asociado con una mortalidad cerca del 20% en 24 hrs, 30% a las 48 hrs, 40% al 7<sup>mo</sup> día y 50% a un mes. Aún con el reparo quirúrgico, la tasa de mortalidad es del 10% a las 24 hrs, 13 % al 7<sup>mo</sup> días y cerca del 20% a los 30 días como recientemente se ha documentado en The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD)<sup>28</sup>.

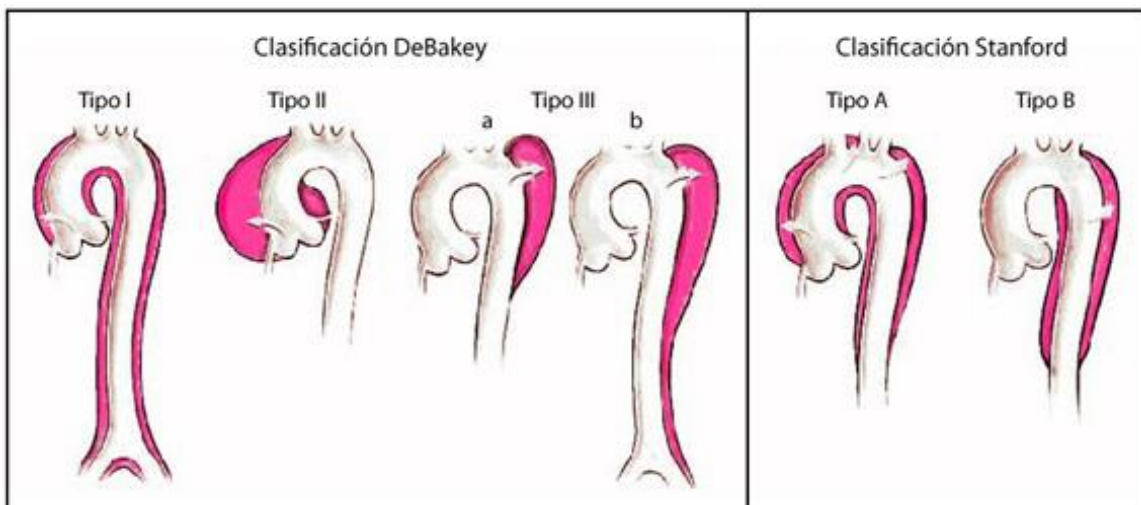


Fig. 5 Clasificación de DeBakey y de Stanford de la disección aórtica<sup>29</sup>.

El manejo quirúrgico de la disección aórtica aguda Stanford A es de urgencia (clase I nivel de evidencia B). La intervención quirúrgica recomendada para la disección aórtica Stanford A, es researla. La disección parcial de la raíz aortica puede ser reparada con la resuspensión de la válvula (procedimiento de David). En la disección extensa de la raíz aortica se debe reemplazar con un injerto valvulado (procedimiento de Bentall y DeBono). (Clase I nivel de evidencia C). La colocación de injerto endovascular no está aprobado para la disección aórtica que envuelve la aorta ascendente o el arco aórtico<sup>30</sup>.

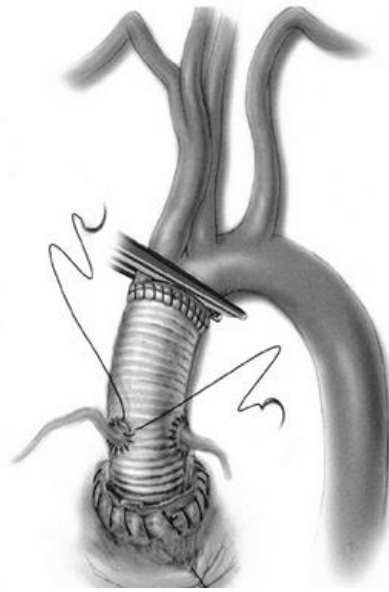


Fig. 6 Cirugía de Bentall y DeBono<sup>3</sup> (tomado de J Coselli), 31.

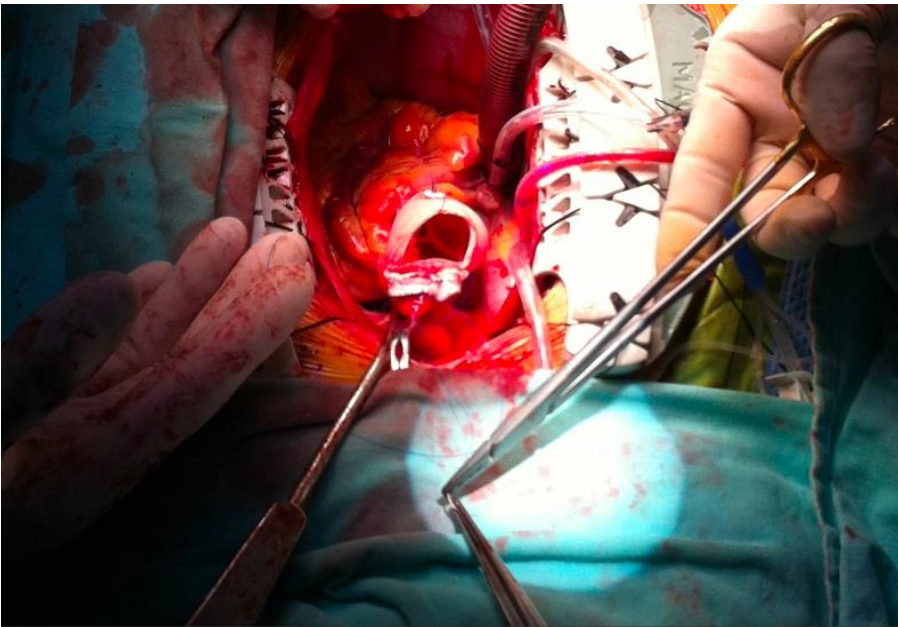


Fig. 7 Cirugía de David<sup>4</sup> (tomado de J Parada et al.) 27.

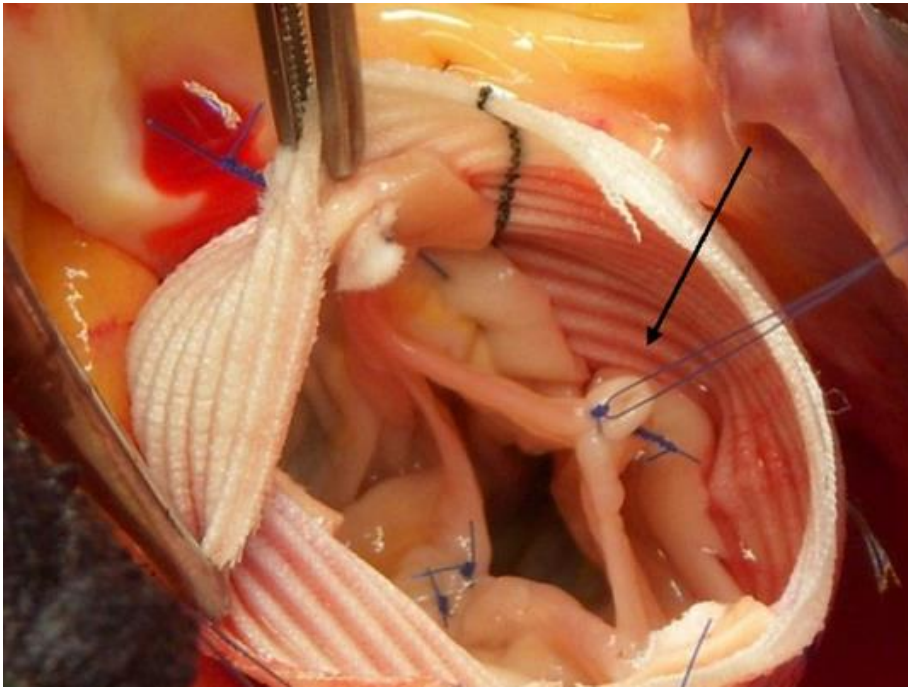


Fig. 8 Fotografía del campo quirúrgico. Aspecto de los velos aórticos tras corrección del prolapso mediante plicatura del borde libre con puntos de prolene 6/0 (tomado de Forteza A) <sup>32</sup>.

Por otro lado, en la progresión de la dilatación se ha demostrado asociación con deterioro de la función contráctil y reducción de la relajación dependiente de endotelio mediada por el NO <sup>16</sup>. En el tratamiento para disminuir la progresión de la dilatación aórtica, se ha propuesto el uso de inhibidores del receptor tipo I de angiotensina II, beta bloqueadores, hidralazina, estatinas sin embargo la terapia antioxidante ha sido poco utilizada <sup>33,34</sup>.

Por lo tanto, la disfunción vasomotora puede determinar la susceptibilidad de formación de aneurismas. La función vasomotora es regulada herméticamente por especies reactivas de oxígeno (ERO) <sup>16</sup>. A baja concentración las ERO regulan el tono vascular, proliferación y la señalización celular. Sin embargo una cuenta excesiva, conducen a estrés oxidante, que es asociado con la patogénesis de enfermedad cardiovascular, incluyendo hipertensión aterosclerosis y diabetes. Esta elevación de ERO es causado por un desbalance entre la producción y neutralización de ERO. Todos los tipos celulares contienen enzimas que generan ERO. Entre las potenciales enzimas pro-oxidantes se encuentran, NAD(P)H oxidase, xantine oxidasa, y oxido nítrico sintasa (NOS), las cuales son las que mejor se han estudiado y se cree que pueden tener un papel dominante en las enfermedades vasculares <sup>16</sup>.

Hasta ahora es bien conocido que el estrés oxidante está asociado con disfunción endotelial en enfermedades vasculares y cardíacas. Y la disfunción endotelial se ha descrito como el deterioro de la vasorelajación dependiente de endotelio por una pérdida de biodisponibilidad de NO en la vasculatura. En la aorta de modelos de ratón con síndrome de Marfan, la relajación dependiente de endotelio mediada por NO se encontró deteriorada <sup>16</sup>. Sin embargo no ha sido claro si este deterioro es el resultado del estrés oxidante.

Recientemente se encontró que la reducción de la actividad de glutatión peroxidasa 1 (GPx1) se correlaciona con un riesgo incrementado de eventos cardiovasculares en pacientes con enfermedad arterial coronaria, se ha hipotetizado que la reducción en la actividad de GPx1 causa secreción de Ciclofilina A (CyPA) y esta condiciona activación paracrina de NF-κB y proliferación de células musculares lisas <sup>35</sup>.

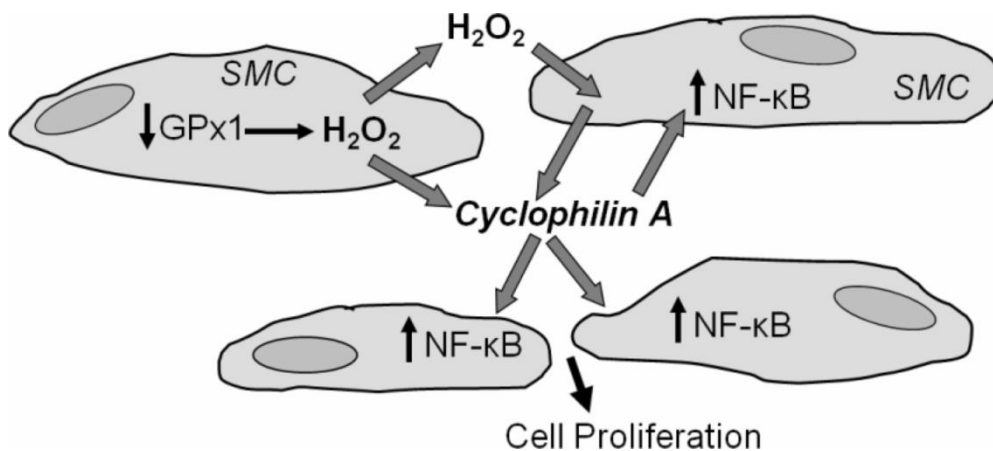


Fig. 9 Relación entre la deficiencia de GPx1 y la ciclofilina A en la activación de la célula vascular (tomado de Takapoo M) <sup>35</sup>.

La reducción en la actividad en GPx1 lleva a un incremento de niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lo cual contribuye a secreción de CyPA y subsecuente activación paracrina de NF-κB y proliferación celular <sup>35</sup>.

Además en pacientes con aneurismas aórticos abdominales se encontró claramente que ERO y el estrés oxidante se encuentra incrementados localmente, pero hasta ahora no se ha podido probar el papel patogénico en la iniciación o progresión del proceso de la enfermedad ni la participación de la capacidad antioxidante a este nivel por las diversas enzimas que utilizan el glutatión <sup>36</sup>.



Por otra parte, la GPx es una selenoproteína que se encuentra en la matriz mitocondrial y en el citoplasma. Esta molécula antioxidante cataliza la reducción de  $H_2O_2$  y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente. Para llevar a cabo su actividad antioxidante la GPx requiere de GSH, produciendo su forma oxidada, el GSSG<sup>37</sup>.

La GST enzima involucrada en el metabolismo de los xenobióticos y en la protección del daño causado por peróxidos, cataliza la ionización del GSH a la forma de anión tiolato nucleofílico ( $GS^-$ ) el cual es capaz de reaccionar espontáneamente con componentes nucleofílicos muy cercanos, seguido de la conjugación del sustrato, la formación del producto y su liberación. Esta conjugación aumenta la solubilidad del producto facilitando su excreción de la célula<sup>11</sup>.

La GSSG-R enzima que cataliza la reducción del GSSG a GSH, es una molécula crítica en la defensa del estrés oxidante manteniendo el ambiente reductor de la célula y es necesaria para regenerar el GSSG a GSH y el GSH pueda ser nuevamente empleado por la GPx<sup>38</sup>.

El GSH es un péptido intracelular de bajo peso molecular, compuesto por ácido glutámico, cisteína y glicina; aproximadamente 90% del glutatión presente en la célula se encuentra en el citoplasma, mientras que el 10% se localiza en la mitocondria. Asimismo 85% del glutatión celular total se encuentra libre, el resto está unido a proteínas. Se ha observado que el GSH tiene una gran variedad de funciones, tales como: la detoxificación de xenobióticos o sus metabolitos. Es el mayor antioxidante endógeno pues por si solo es un inhibidor de los radicales  $\cdot OH$  y  $O_2^-$ , además tiene la capacidad de regenerar a las vitaminas E y C, reconvirtiéndolas a su forma activa y es cofactor de la enzima GPx, de esta manera el GSH favorece el mantenimiento del estado redox celular. Otras funciones metabólicas del GSH incluyen el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática, así como el almacenamiento de cisteína<sup>6</sup>.

Por lo antes considerado, la participación del estrés oxidante en sujetos con SM esta presente, además las enzimas que emplean el glutatión podrían estar implicadas, pero estas no se han determinado.

## **PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

La dilatación de la aorta es un problema de salud con consecuencias devastadoras, este hallazgo es la causa de mortalidad y de mal pronóstico en pacientes con síndrome de Marfan, los cuales en su mayoría son pacientes jóvenes en la etapa productiva de la vida, La prevalencia del daño aórtico es de 75.8% en estos pacientes<sup>39</sup>, y el 68% desarrollara dilatación de la raíz aórtica antes de los 19 años <sup>40</sup>.

Los estudios de investigación básica son relevantes para entender los mecanismos que participan en la formación y la progresión del aneurisma en los pacientes con SM, con la finalidad de evaluar si en la terapia de estos pacientes se debe considerar el daño por estrés oxidante.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La actividad de las enzimas que emplean el GSH en el tejido del aneurisma y/o disección de la aorta torácica de los pacientes con SM podrían estar disminuidas y favorecer el estrés oxidante?

## **OBJETIVO (principal).**

Evaluar la actividad de las enzimas que emplean el glutatión en pacientes con síndrome de Marfan, que fueron sometidos a cirugía por daño aórtico.

## **OBJETIVOS (específicos).**

- Determinar el índice de lipoperoxidación.
- Determinar la actividad de las enzimas: glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión-S-transferasa.
- Determinar la concentración de glutatión reducido y glutatión oxidado.
- Evaluar la capacidad antioxidante del sistema no enzimático.

## **HIPÓTESIS**

En el SM se encuentran disminuidas las enzimas que emplean el GSH en el aneurisma aórtico lo que favorece el estrés oxidante.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Diseño del estudio:**

Se trata de un estudio transversal prospectivo, anidados en una cohorte.

Muestreo no probabilístico de casos consecutivos

### **Población en estudio:**

Pacientes diagnosticados con SM candidatos a corrección quirúrgica de aneurisma aórtico.

### **Criterios de Inclusión:**

Tejido aórtico de sujetos con síndrome de Marfan, a partir de criterios de Ghent que fueron sometidos a cirugía de aorta en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

### **Criterios de Exclusión:**

Tejido aórtico de pacientes que se llevaron a procedimiento quirúrgico de aorta; Bentall o David, pero sin embargo, la cantidad fue insuficiente para realizar todas las determinaciones.

**Pacientes:** Se evaluaron por Reumatóloga experta de acuerdo a los criterios de Ghent. (2010) con diagnóstico confirmado de acuerdo a la presencia de dos criterios mayores.

### **Eliminación de medicamentos:**

Siete días antes de la cirugía se suspendieron los AINES, estatinas y 24 horas antes el clopidogrel.

### **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 sacarosa [0.25mM sacarosa, 10mM Tris, 1mM de etilendinitrilotetracetato disódico (EDTA) a pH de 7.35], en presencia de inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 2 µM pepstatina A, 2 µM leupeptina y 0.1% de aprotinina) y 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 <sup>41</sup>.

### **Evaluación de capacidad antioxidante del sistema no enzimático (FRAP).**

A 100µg proteína del homogenizado de aorta, se le agregó 1.5 ml de mezcla de reacción; la cual consistió de 300mM de amortiguador de acetatos pH 3.6, 20mM de hexahidrato de cloruro férrico, 10 Mm de TPTZ (2,4,6 Tris-2-pyridil-s- trizina) disuelto en 40 mM de ácido clorhídrico (HCl) en una relación de 10:1:1 v/v respectivamente; se mezcló vigorosamente en vortex por 5 segundos y se incubó a 37°C por 30 minutos en oscuridad, finalmente la absorbencia se midió a 593 nm. La curva de calibración se obtiene usando Trolox 51<sup>42</sup>.

**Lipoperoxidación (TBARS).** A 100 µg de proteína del homogenizado de aorta, se le agregó 50 µl de metanol al 4% (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol), más 1ml de buffer fosfato 50mM, pH 7.3. Se mezcló vigorosamente en vortex por 5 segundos, se incubó en baño de agua a 37 °C por 30 minutos. Luego se añadió 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico a 0.8M y se incubó en baño de agua a 100°C por 1 hora. En este momento para detener la reacción, la muestra fue colocada en hielo; luego se agregó 1 ml KCL 5% por muestra más 4 mL de n-butanol, se mezcló vigorosamente en vortex por 30 segundos y se centrifugó a 2000 rpm. a temperatura ambiente por 2 minutos. Se extrajo la fase de n-butanol y se leyó la absorbencia a 532 nm 52<sup>43</sup>.

### **Glutación peroxidasa (GPx).**

La actividad de la enzima GPx fue medida por espectrofotometría: 100 µg de proteína del homogenizado de aorta se le agregó 1.6 mL de buffer fosfato 50mM, pH 7.3, más NADPH 0.2 mM , GSH 1 mM, glutación reductasa 1UI/mL y 100 µL de 0.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La mezcla se incubó por 10 minutos a 37°C, y se leyó a 340 nm. La actividad de la GPx se expresa en µmol NADPH oxidado por minuto por mg de proteína<sup>44</sup>.

### **Glutación-S- transferasa (GST).**

La actividad de la enzima GST fue medida por espectrofotometría: 100 µg de proteína del homogenizado de aorta se le agregó 1.6 mL de buffer fosfato 50mM, pH 7.3, más 300 µl de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzina) 10mM y 300 µl de GSH 10mM. La mezcla se incubó por 10 minutos a 37°C, y se leyó la absorbencia a 340 nm.

Los valores de la actividad de la GST se expresan en unidades de GST por minuto 54, una unidad de actividad de GST se define como un µmol de GS-DNB por minuto a 37°C

### **Glutación reductasa (GSSG-R).**

A 100  $\mu\text{g}$  de proteína del homogenizado de aorta se le agregó 800  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 0.2 mM, pH 7.3, más 0.5 mM de EDTA, 100  $\mu\text{L}$  de NADPH 0.1 mM, y 100  $\mu\text{L}$  de GSSG 1mM, se incubó a 37 °C por 10 minutos y se leyó la absorbencia a 340 nm.

La actividad de la GSSG-R se expresan en  $\mu\text{mol}$  de GSSG reducido por minuto por mg de proteína<sup>10</sup>.

### **Glutación reducido (GSH).**

A 100  $\mu\text{g}$  de proteína del homogenizado de aorta se le agregaron 900  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato 50mM, pH 7.3, más 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Ellman (5,5' dithiobis 2-nitrobenzoico) 1M, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se leyó la absorbencia a 412 nm. La curva de calibración se realizó con GSH a una concentración de 5 a 25  $\mu\text{mol/ml}$  56<sup>45</sup>.

### **Glutación oxidado (GSSG).**

A 100  $\mu\text{g}$  de proteína del homogenizado de aorta se le agregaron 900  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato 50mM, pH 7.3, más 100  $\mu\text{l}$  de reactivo de Ellman (5,5' dithiobis 2-nitrobenzoico) 1M, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, después se le agregaron 8  $\mu\text{l}$  de 4-vinilpiridina, se agitó 5 segundos en vortex y se leyó la absorbencia a 412 nm. La curva de calibración se realizó con GSSG a una concentración de 5 a 25  $\mu\text{mol/ml}$  57<sup>45</sup>.

### **Análisis estadístico:**

El análisis estadístico fue realizado con el programa SigmaPlot 12.3 Los datos numéricos cuantitativos con distribución gaussiana son presentados con la media  $\pm$  SEM. La diferencia de medias entre grupos se evaluó con t-student.

Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a partir de  $p < 0.05$ .

### **Consideraciones éticas:**

El estudio se realizó con las normas éticas internacionales y con la Ley General de Salud, así como con la declaración de Helsinki, modificada en el Congreso de Tokio, Japón.

## RESULTADOS

Un total de 17 pacientes, 13 hombres y 4 mujeres con edad promedio de  $37.7 \pm 3.91$

Las características de los pacientes se muestran en la cuadro 2 y 3.

Cuadro 2: Características generales de los pacientes.

Características	Control	Marfan	Total
Sexo (%)			
Femenino	0	28.57	23.52
Masculino	100	71.43	76.47
Edad (años)	$41.00 \pm 20.8$	$37.00 \pm 2.90$	$37.71 \pm 3.91$
Diámetro de la aorta (mm)	$35.67 \pm 6.36$	$75.64 \pm 5.39^*$	$68.59 \pm 5.90$

\* Control vs. Marfan  $p=0.005$ . Los datos se expresan en media  $\pm$  error estándar

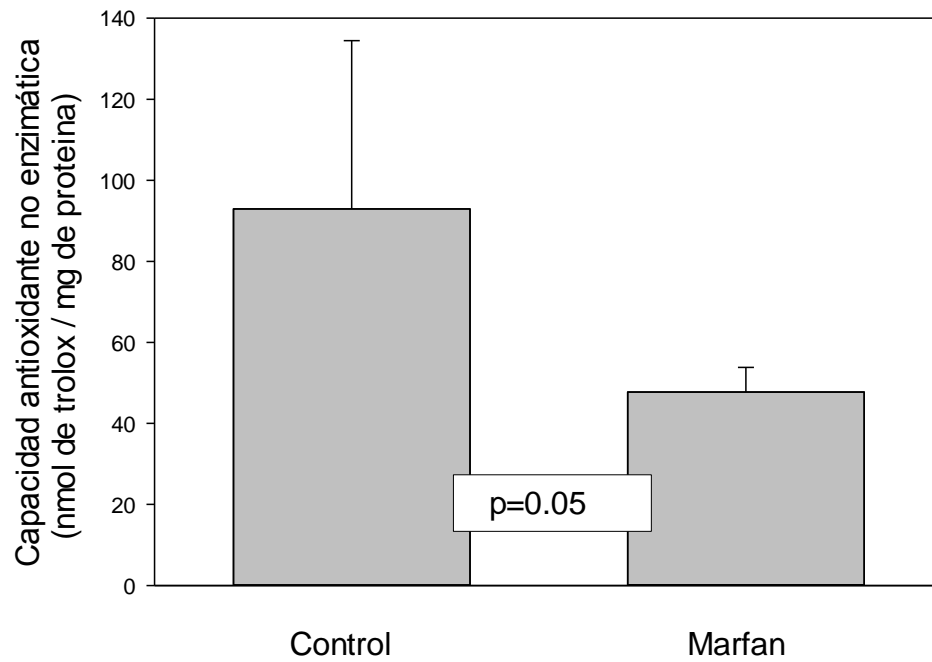
Cuadro 3: Hallazgos clínicos, tipo de cirugía y reporte del diámetro aórtico.

Genero	Edad	Diagnóstico	Hallazgos Clínicos	Diámetro Aórtico (mm)
M	51	Control	Estenosis Ao	35
M	71	Control	Estenosis Ao	47
M	1	Control	Aneurisma sacular	25
F	26	Marfan	Estenosis aortica	120
M	37	Marfan	Dilatación raíz Ao y Ao Asc	105
M	35	Marfan	Raíz aortica	69
F	55	Marfan	Dilatación seno de valsalva	50
M	46	Marfan	Seno de valsalva dilatación	50
M	37	Marfan	senos de valsalva	55
F	31	Marfan	Aneurisma Ao Asc disección	60
M	27	Marfan	Aneurisma Ao	87
M	26	Marfan	Aneurisma Ao Asc sin disección	76
M	33	Marfan	Dilatación raíz Ao y Ao Asc	77
M	50	Marfan	Aneurisma aórtico torácico	78
M	36	Marfan	Aneurisma De Ao Asc	72
F	56	Marfan	Dilatación raíz Ao y Ao Asc	69
M	23	Marfan	Senos de valsalva	91

F: Femenino, M: Masculino, Ao: Aorta, Asc: Ascendente.

### Capacidad antioxidante del sistema no enzimático (FRAP).

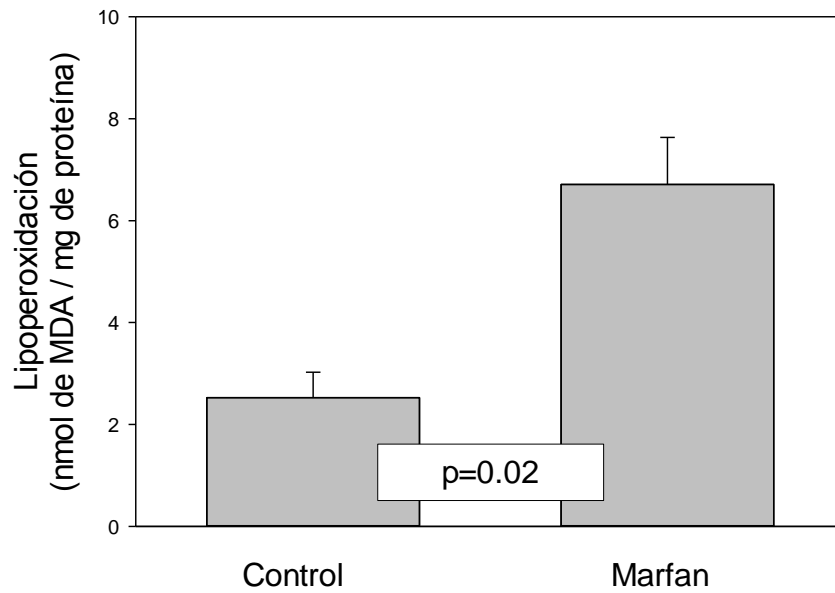
La capacidad antioxidante no enzimática disminuyó significativamente en el grupo de pacientes con Marfan en comparación a los pacientes del grupo control ( $p=0.05$ ).



Grafica 1.

## Lipoperoxidación (TBARS).

El índice de lipoperoxidación se incremento significativamente en el grupo de pacientes con Marfan en comparación a los pacientes del grupo control ( $p=0.02$ ).

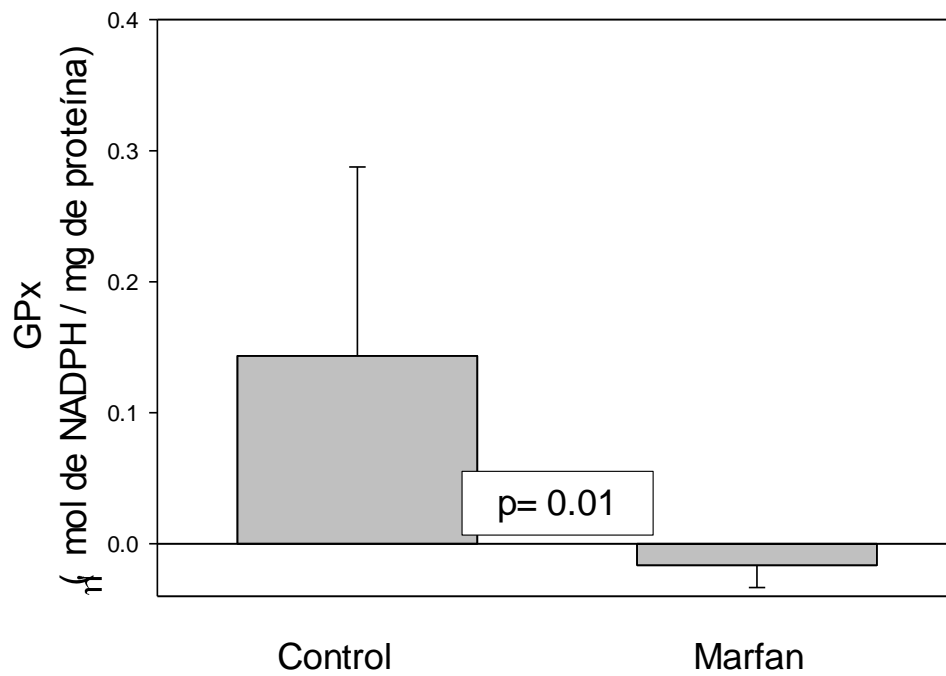


Grafica 2.



### Glutación peroxidasa (GPx).

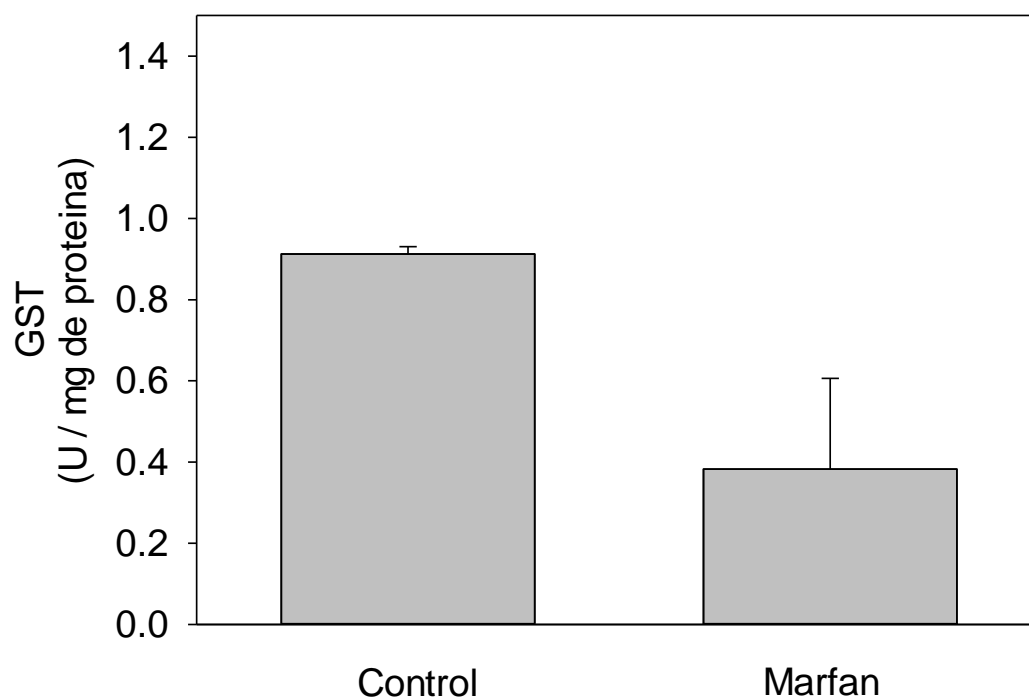
La actividad de la GPx disminuyó significativamente en el grupo de pacientes con Marfan en comparación a los pacientes del grupo Control ( $p=0.01$ ).



Grafica 3.

### Glutación-S- transferasa (GST).

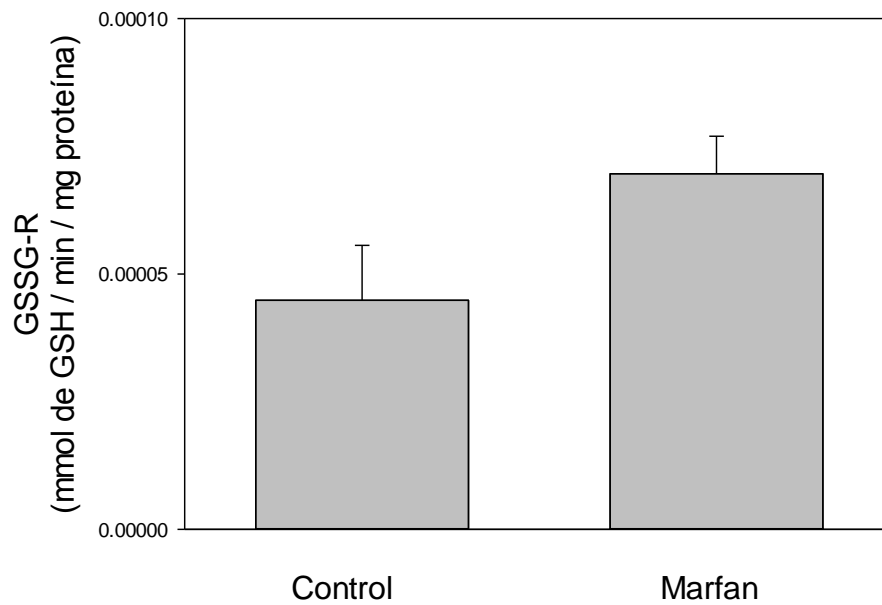
La actividad enzimática de la GST no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos, sin embargo en el grupo de pacientes con Marfan presentó tendencia de menor actividad.



Grafica 4.

### Glutación reductasa (GSSG-R).

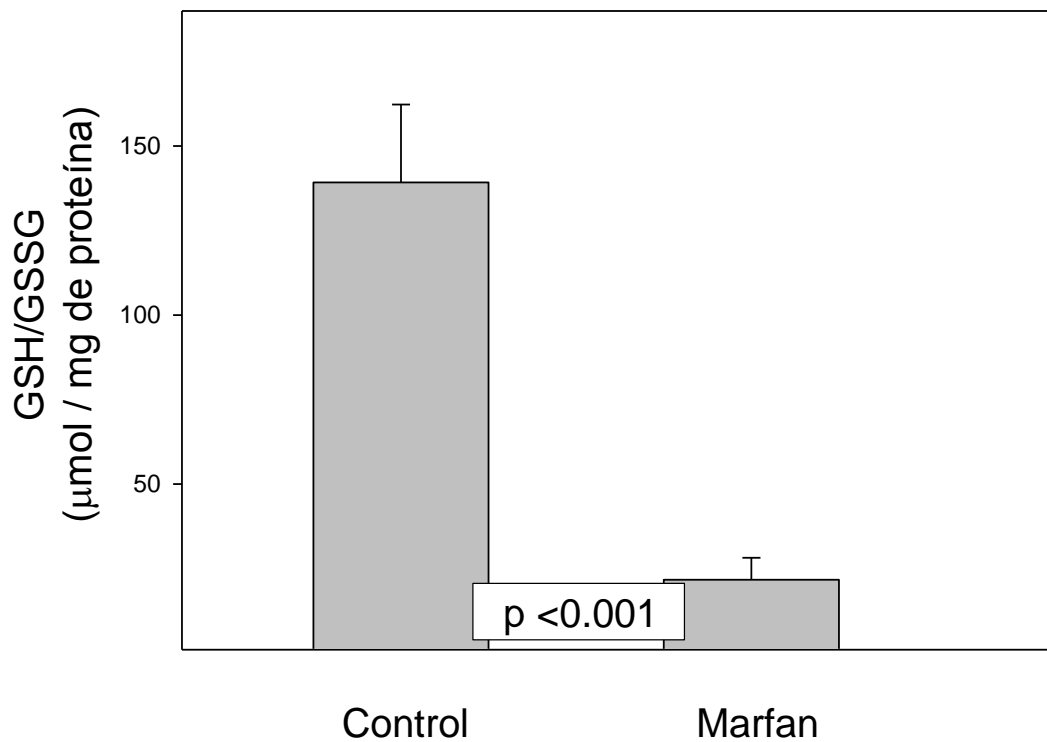
La actividad enzimática de la GSSG-R no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos, sin embargo en el grupo de pacientes con Marfan presentó tendencia de mayor actividad.



Grafica 5.

### Índice Glutación reducido (GSH):Glutación oxidado (GSSG).

El índice de GSH:GSSG disminuyó significativamente en el grupo de pacientes con Marfan en comparación a los pacientes del grupo control ( $p < 0.001$ ).



Grafica 6.

## DISCUSIÓN

En el SM, como en toda enfermedad compleja, la causa del daño a los diversos órganos y sistemas es multifactorial, por lo tanto, es posible que el exceso en la producción de las ERO sea un factor que contribuya a la degeneración de la pared arterial <sup>17</sup> y formación de aneurismas en el segmento torácico de la aorta característicos de este síndrome.

Los datos obtenidos en esta investigación, confirman que existe participación del estrés oxidante en la formación de aneurismas en el SM, ya que se encontró disminuida la capacidad antioxidante no enzimática, lo que explica en parte el incremento observado en el índice de lipoperoxidación en el homogenado del aneurisma aórtico. Estos resultados concuerdan con otros estudios realizados en el tejido aórtico de estos pacientes, en donde se reportó que el índice de lipoperoxidación esta incrementado <sup>18</sup>, mientras que en el suero se encontró que la capacidad antioxidante total esta disminuida y la carbonilación incrementada<sup>9,46</sup>

Por otro lado, el mecanismo por el cual se producen las ERO que contribuyen al daño aórtico en el SM no está bien definido; sin embargo, se ha observado que en el tejido aórtico proveniente de pacientes con SM la expresión de la enzima iNOS esta incrementada al igual que los nitratos y nitritos <sup>18</sup>, lo que podría indicar que parte del daño oxidativo de estos individuos también es causado por especies reactivas de nitrógeno (ERN). Además en modelos animales se ha observado que la expresión de las enzimas precursoras del  $O_2^-$ , xantina oxidasa y NADPH oxidasa están incrementadas al igual que la expresión de la iNOS que es precursora del NO en el proceso de inflamación <sup>16</sup>. Se ha reportado que la tasa de reacción existente entre el NO y el  $O_2^-$  es tres veces mayor que la tasa de reacción entre el  $O_2^-$  y la SOD, esto promueve la formación del peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y su acumulación dentro de la célula, lo que incrementa el daño celular por oxidación. En un estudio *in vitro* realizado en células musculares de aorta de rata, la exposición a  $ONOO^-$  indujo apoptosis en forma dependiente de la concentración, mediada por la activación de endonucleasas <sup>47,48</sup>.

Ahora bien, se ha reportado que el GSH por sí mismo es capaz de reducir al ONOO<sup>-</sup> y su depleción está asociada al incremento de las ERO y de la lipoperoxidación <sup>49</sup>. Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que el índice GSH/GSSG está disminuido en los pacientes con SM en comparación con los sujetos control, lo que indica cambios en el estado redox asociado al balance de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular <sup>50</sup>, en la aorta de estos pacientes.

Los resultados de la actividad de GPx, mostraron que esta disminuida en el tejido aórtico de los pacientes SM en comparación con los sujetos control, esta disminución podría ser explicada por varios factores, entre ellos, la concentración elevada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> celular, pues se ha visto que altas concentraciones de esta ERO incrementa la actividad de la enzima catalasa (CAT) y disminuye la actividad de la GPx <sup>51</sup> en un estudio previo se demostró que la actividad de las enzimas CAT y GPx se encuentra aumentada y disminuida respectivamente en los pacientes con SM <sup>18</sup>. Sin embargo, es posible que en los pacientes con SM el selenio esté disminuido, como ha sido descrito en otras patologías cardiovasculares <sup>52</sup>. El selenio es parte de un proceso único de regulación en esta enzima, pues su inserción determina el centro activo de la GPx, por lo tanto la disminución o la ausencia del selenio afecta su expresión y actividad cerca de niveles no detectables <sup>53</sup>. Cabe mencionar que la GPx regula la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con efecto modulador en la vía de señalización para los factores de crecimiento <sup>54</sup> por lo que la disminución en la actividad de esta enzima podría también estar asociada a las alteraciones del SM en los casos donde la vía de señalización del TGF-β está implicada en el desarrollo de la enfermedad <sup>23</sup> Por otro lado, se ha reportado que la GPx también es capaz de actuar como reductasa del ONOO<sup>-</sup> <sup>55</sup>, por lo que la disminución en la actividad de la GPx podría implicar la acumulación de las ERN dentro de las células musculares de la aorta de los pacientes con SM lo que podría contribuir a la formación del aneurisma.

En cuanto a la actividad de la GST en los pacientes con SM, esta se encontró disminuida en comparación al control. Se ha descrito que GST interviene en la detoxificación de xenobióticos, aldehídos, quinonas, epóxidos e hidroperóxidos

formados como metabolitos secundarios durante el estrés oxidante, en un estudio de pacientes con SM se observó que la actividad de GST disminuyó y se incrementó el índice de lipoperoxidación, lo que afecta la permeabilidad y fluidez de la membrana celular por la formación de un enlace tio-eter <sup>18</sup>. En otras patologías que afectan el sistema cardiovascular en humanos y modelos murinos asociadas al estrés oxidante, se ha observado la disminución en la expresión de la GST aunada al incremento de la lipoperoxidación. Además se ha descrito que la regulación de esta enzima es independiente a las concentraciones de selenio a diferencia de la GPx, sin embargo ambas enzimas ofrecen a la célula protección contra los daños mediados por las ERO <sup>56</sup>.

Por la importancia de las funciones del GSH como antioxidante y cofactor de las enzimas GPx y GST para en el mantenimiento del estado redox en los sistemas biológicos, dentro de la célula, se ha dado lugar a un mecanismo para el control de los niveles de GSSG y re-establecer el GSH mediado por la GSSG-R. Esta enzima utiliza NADPH como cofactor <sup>57</sup> se ha descrito que este equivalente reductor se produce en la vía colateral de las pentosas fosfato, donde la oxidación alternativa de glucosa no genera ATP, ya que su propósito es proporcionar ribosa-5-fosfato y NADPH para la síntesis de ácidos grasos y esteroides o, como ya se ha mencionado, como un cofactor para la GSSG-R <sup>58</sup> En los resultados se observó que la GSSG-R presenta tendencia a incrementarse en los pacientes con SM, sin que sea posible re-establecer el estado redox del GSH lo que a su vez limita la actividad de las enzimas GPx y GST.

## **CONCLUSIÓN**

Las alteraciones en la actividad de las enzimas que emplean el GSH relacionadas a cambios estructurales y funcionales en la aorta torácica de los pacientes con SM, están asociadas a la disminución en la capacidad antioxidante y la presencia de lipoperoxidación.

## **PERSPECTIVA**

Estos hallazgos sugieren la necesidad de considerar en la terapia el contexto clínico de cada paciente el daño por estrés oxidante y el empleo de agentes antioxidantes que mejoren el estado redox del paciente.



## Bibliografía

1. Isselbacher EM. Diseases of the aorta . Braunwald E. En Braunwald's Heart Disease: A textbook of Cardiovascular Medicine , 7 th edition. Editors: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. Elsevier Saunders Company. Philadelphia. 2005: 1403-1435.
2. DeBakey ME, Henly WS, Cooley DA, Morris GC Jr, Crawford ES, Beall AC Jr. Surgical management of dissecting aneurysms of the aortaA1965. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 49: pp. 130–49.
3. Bentall HH, De Bono A. A technique for complete replacement of the ascending aorta. *Thorax.* 1968; 23:338-9.
4. David TE et al. Aortic Root Aneurysm: Principles of Repair and Long-Term Results. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010.
5. Yacoub MH y cols.: Late results of a valve-preserving operation in patients with aneurysms of the ascending aorta and root. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115: 1080-90.
6. Ribas V, García-Ruiz C and JoséC.Fernández-Checa, Glutathione and mitochondria. *Fronteras en farmacología*, July2014;151:1-18.
7. Marnett LJ . M, Daño de ADN peroxidación lipídica por malondialdehído. *Mutat Res*, 1999 08 de marzo; 424 (1-2):83-95.
8. Benzie IFF, Strain JJ (1999) Ferric reducing /antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 299: 15-27.
9. Laurence R.A.,Burk R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochemical and biophysical research communications.* 1976; 71: 952.
10. Deponte M (May 2013). "Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes". *Biochim. Biophys. Acta* **1830** 5: 3217–66.
11. Vararattanavech A, Ketterman AJ. Multiple roles of glutathione binding-site residues of glutathione s-transferase. *Protein Pept Lett.* 2003; 10:441-448.
12. Aviña Fierro JA, Hernández Aviña DA, Síndrome con hábitos marfanoides. *Rev Mex Pediatr* 2011; 78; 236-241
13. Guido H.W. Van Bogerijen, Jip L. Tolenaar, Viviana Grassi, Chiara Lomazzi, et al. Biomarkers in TAA-The Holy Grail. *Progress in Cardiovascular Disease* 2013; 109-115.
14. Gregory A. Kuzmik, BA, Adam X. Sang, BA, and John A. Natural history of thoracic aortic aneurysms. *J. Vasc Surg* 2012; 56:565-571.
15. Hugar BS, Praveen S, Kainoor SK, Shetty AR. fSudden death in marfan syndrome. *J Forensic Sci.* 2014 Jul;59(4):1126-8.
16. Yang HH, van Breemen C, Chung AW Vasomotor dysfunction in the thoracic aorta of Marfan syndrome is associated with accumulation of oxidative stress.. *Vascul Pharmacol.* 2010 Jan-Feb;52(1-2):37-45.
17. Xiong W, Mactaggat J, Knispel R, Worth J, Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm formation in a murine model. *Atherosclerosis* 202 (2009) 128-134.

18. Soto ME, Soria-Castro E, Guarnier V, Muruato-Ontiveros E, Herández-Mejía BI, Martínez-Hernández HJ, Barragán R, Herrera V and Perez-Torres I, Analysis of Oxidative Stress Enzymes and Structural and Functional Proteins on Human Aortic Tissue from Different Aortopathies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2014, 13 pages, July 2014.
19. Mas Romero C, Iturrino Monge R, Protocolo de manejo cardiovascular del Síndrome de Marfan. *Rev. costarric. cardiol* vol.6 n.3 San José Sep. 2004.
20. Hironao Numabe, M.D. Information resources for genetic testing. *Nihon Rinsho*. 2010 Aug; 68 Suppl 8:327-34.
21. Robinson PN, Booms P, Katzke S, et al. Mutations of FBN1 and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies. *Hum Mutat*. 2002;20:153-61.
22. Díaz Domínguez E, Larrazábal A, Ruiz MJ, Gen FBN1; Proteína: Fibrilina; Síndrome de Marfan. Wikispaces. Creative Commons Attribution Share-Alike 3.0 license 2014.
23. Wheeler JB, Ikonomidis JS, Jones JA Connective tissue disorders and cardiovascular complications: the indomitable role of transforming growth factor-beta signaling. *Adv Exp Med Biol*. 2014.
24. Nataatmadja M, West J, Prabowo S, West M Angiotensin II Receptor Antagonism Reduces Transforming Growth Factor Beta and Smad Signaling in Thoracic Aortic Aneurysm. *Ochsner J*. 2013 Spring;13(1):42-8.
25. Cabrera Bueno F, Gallego García De Vinuesa P, Evangelista Masip A, Nuevos criterios diagnósticos en el síndrome de Marfan. *CardiCore* 46. Núm. 03. Julio 2011- Septiembre 2011.
26. De Paepe A, Devereux RB, Dietz HC, Hennekam RC, Pyeritz RE. Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *Am J Med Genet*. 1996; 62:417-26.
27. Dr. J. Parada, MD, E.H. Núñez-Garrido, MD, M. Carmona, MD, Dr. V. Herrera-Alarcon, MD, H.J. Martínez, Cirugía de Bentall y De Bono con sustitución de arco y revascularización de troncos supra aórticos. XII Congreso Anual de la Sociedad Mexicana de Cirugía Cardíaca, Servicio de Cirugía Cardiorrástica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.
28. Peter G. Hagan, MD; Christoph A. Nienaber, MD; Eric M. Isselbacher, MD; David Bruckman, MD; Dean J. Karavite; Pamela L. Russman, MD; Arturo Evangelista, MD; Rossella Fattori, MD; Toru Suzuki, MD; Jae K. Oh, MD; Andrew G. Moore, MD; Joseph F. Malouf, MD; Linda A. Pape, MD; Charlene Gaca, RN; Udo Sechtem, MD; Suzanne Lenferink, MD; Hans Josef Deutsch, MD; Holger Dierichs, MD; Jose Marcos y Robles, MD; Alfredo Llovet, MD; Dan Gilon, MD; Sugata K. Das, MD; William F. Armstrong, MD; G. Michael Deeb, MD; Kim A. Eagle, MD The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD) New Insights Into an Old Disease. *JAMA*. 2000;283(7):897-903. doi:10.1001/jama.283.7.897.
29. Kouchoykos, Dougenis, Medical Progress; Clasificación de DeBakey y de Stanford de la disección aórtica. *Surgery of the Thoracic Aorta. N Eng J Med* 1997; 336: 1876-1888.
30. Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, Bersin RM, Carr VF, Casey DE Jr, Eagle KA, et al 2010 ACCF/AHA/AATS/STS Guidelines for the diagnosis and management of patients with thoracic aortic disease American College

- of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American Association for Thoracic Surgery; American College of Radiology; American Stroke Association; Society of Cardiovascular Anesthesiologists; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society of Interventional Radiology; Society of Thoracic Surgeons; Society for Vascular Medicine. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Apr 6;55(14):e27-e129.
31. Coselli JS, Conklin L, Lemaire SA, Una estrategia eficaz para la optimización de la hemostasia tras la sustitución de la raíz aórtica. *J Vasc Br* 2003; 2 (3) : 182-5.
  32. Forteza A, Centeno J, Bellota Bellot R, López Gude MJ, Pérez de la Sota E, Sánchez V, Rupilanchas JJ, Cortina J. Cirugía de preservación valvular en 120 pacientes con aneurismas de la raíz aórtica, *Rev Esp Cardiol*. 2011;64:470-5 - Vol. 64 Núm.
  33. Peter Danyi MD, MPH, MB, Ion S. Jovin, MD, ScD. Is losartan the true panacea for aneurism disease? *Cardiol Cin* 2010; 28: 279-285.
  34. Peter Danyi, John A, Elefteriades, and John S. Jovin. Medical therapy of thoracic aortic aneurisms. *Trends Cardiovasc Med* 2012; 22: 180-184.
  35. Takapoo M, Chamseddine AH, Bhalla RC, and Miller MJ Jr. Glutathione Peroxidase-Deficient Smooth Muscle Cells Cause Paracrine Activation of Normal Smooth Muscle Cells via Cyclophilin A *Vascul Pharmacol*. 2011 November ; 55(5-6): 143–148.
  36. Miller FJ Jr, Sharp WJ, Fang X, Oberley LW, Oberley TD, Weintraub NL Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Apr 1;22(4):560-5.
  37. Paglia D. E. Valentine W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med*. 1967; 70: 158-169.
  38. Deponte M (May 2013). "Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes". *Biochim. Biophys. Acta* **1830** (5): 3217–66.
  39. Porciani MC, M Attanasio, Lepri V, Lapini I, Demarchi T, L Padeletti, Pepe T, R Abbate, Gensini GF, Prevalencia de manifestaciones cardiovasculares en el síndrome de Marfan. *Ital Corazón J Supl*. 2004 Aug; 5 (8) :647-52.
  40. Elhadi H. Aburawi and John O'Sullivan, Relation of aortic root dilatation and age in Marfan's syndrome. *European Heart Journal* (2007) 28, 376–379.
  41. Bradford MM A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantiles of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
  42. Zúñiga-Muñoz AM, Guarner V, Díaz-Cruz A, Díaz-Díaz E, Nava-cuellar C, Beltrán-Rodríguez U and Pérez-Torres I, Modulation of Oxidative Stress in Fatty Liver of Rat with Metabolic Syndrome by Hibiscus Sabdariffa. *Immn., Endoc. & Metab. Agents in med. Chem*. 2013, 13 196-205.
  43. Pérez-T.I., Roque P., El Hafidi M., Díaz-Díaz E., Baños G. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radic Res*. 2009; 43: 761-771.
  44. Flohé L., GÜNZLER W. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymology*. 1984; 105: 114-121.

45. Ellman GL, Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives of biochemistry and Biophysics* 82, 70-77 (1959).
46. Fiorillo, M. Becatti, M. Attanasio, L. Lucarini, N. Nassi, L. Evangelisti, M.C. Porciani, P. Nassi, G.F. Gensini, R. Abbate, G. Pepe, Evidence for oxidative stress in plasma of patients with Marfan syndrome. *Int J Cardiol.* 2010 Dec 3;145 (3):544-6.
47. Cai H, Harrison DG, Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases The Role of Oxidant Stress. *Circ Res.* 2000; 87:840-844.
48. Li JM, Shah AM. Endothelial cell Superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R1014-R1030.
49. Rajassekaran NS, Sathyanarayanan S, Devaraj H. Chronic depletion of glutathione (GSH) and minimal modification of LDL in vivo: its prevention by glutathione mono ester (GME) therapy. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1741: 103-12.
50. Cisneros R, Oré R, Arnao I, Suárez S, Relación de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en ratas diabéticas tratadas con maca (*Lepidium meyenii* Walp) *An Fac med.* 2011;72(2):107-11
51. Cisneros-Prego E, La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Rev Cubana Investi Biomed* 14(1).
52. Dariush Mozaffarian, Fish, Mercury, Selenium and Cardiovascular Risk: Current Evidence and Unanswered Questions. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2009, 6, 1894-1916;
53. Lubos E, Sinninga CR, Schnabela RB, Wilda PS, Zellera T., Rupprecht HJ, et al. Serum selenium and prognosis in cardiovascular disease: Atherosclerosis, autor manuscript PMC 2010, August 16.
54. Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ: Regulation and function of selenoproteins in human disease *Biochem J* 2009, 422:11-22.
55. Edith Lubos, Joseph Loscalzo, and Diane E. Handy, Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 2011;15, 1957–1997.
56. Hayes JD<sup>1</sup>, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51-88.
57. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem.* 1988 Nov 25;263(33):17205-8.
58. Mayes, P.A(1993) The pentose phosphate pathway and other pathways of hexose metabolism. In *Harper's Biochemistry* (Murray, R., Granner, D., Mayes, P., and Rodwell, V., eds) pp. 201–211, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut.

