

FACTORES PRONÓSTICO NO CONVENCIONALES EN INSUFICIENCIA CARDIACA

GABRIELA SPECKER

TUTOR: DR. DANIEL MURILLO

COTUTORA: DRA. ANA DENICOLA

DICIEMBRE 2013

ÍNDICE

ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
INSUFICIENCIA CARDIACA	4
EPIDEMIOLOGÍA	5
FISIOPATOLOGÍA Y PROGRESIÓN	7
FACTORES DIAGNOSTICO CONVENCIONALES EN INSUFICIENCIA CARDIACA	12
ESTRÉS OXIDATIVO Y ESPECIES REACTIVAS	14
HIPOTESIS OXIDATIVA DE LA IC	19
FUENTES DE ESPECIES REACTIVAS EN IC	21
DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN EL CORAZÓN	27
CONSECUENCIAS DEL AUMENTO EN LAS ESPECIES REACTIVAS	30
DAÑO OXIDATIVO	30
ALTERACIONES EN LA SEÑALIZACION REDOX	32
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	36
OBJETIVOS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

ABREVIATURAS

IC -- Insuficiencia Cardíaca

SRAA -- Sistema Renina- Angiotensina-Aldosterona

FEVI -- Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo

CF -- Clase Funcional de la New York Heart Association

SNS – Sistema Nervioso Simpático

ROS -- Especies reactivas del oxígeno

RNS -- Especies reactivas del nitrógeno

SOD -- Superóxido Dismutasa

XO -- Xantina oxidasa

MAO -- Monoamino oxidasa

IAM -- Infarto agudo de miocardio

NOS -- Óxido Nítrico Sintasa

CR -- Cadena Respiratoria

DTNB -- 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico

TPTZ -- Tripiridiltriazina

S -- Sulfamida

N – Naftiletildiamina

oxiHb -- Oxihemoglobina

metHb – metahemoglobina

RESUMEN

La insuficiencia cardíaca (IC) es un síndrome clínico caracterizado por signos y síntomas de sobrecarga de volumen en los vasos sanguíneos y el intersticio que incluye dificultad respiratoria y edema en los miembros inferiores, así como manifestaciones de inadecuada perfusión de tejidos como fatiga. En este síndrome, el corazón desarrolla un estado patológico en el que es incapaz de bombear la sangre al ritmo requerido por las necesidades metabólicas del organismo, o solo lo puede lograr bajo presiones patológicamente elevadas.

Actualmente, se entiende que la IC es una patología progresiva altamente compleja que presenta manifestaciones extracardíacas, incluyendo cambios hemodinámicos, neurohormonales y renales que intentan mantener la homeostasis circulatoria. En la clínica, el diagnóstico y determinación de la gravedad de la IC se realiza a través de la evaluación fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) y la clase funcional de la New York Heart Association (NYHA).

Se ha encontrado evidencia que indica que la disfunción ventricular aumenta como resultado del aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS/RNS), lo que resultó en la formulación de la hipótesis oxidativa de la IC, que postula que la IC está caracterizada por un estrés oxidativo específico del corazón y sistémico que resulta en una función miocárdica disminuida. Las ROS y RNS son producidas en el corazón por varios mecanismos, como producto secundario de la fosforilación oxidativa, como producto de la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa y la óxido nítrico sintasa. Estas especies están implicadas en los procesos de patogénesis cardíaca como hipertrofia, contracción reducida, apoptosis de miocitos, remodelación del miocardio, entre otros.

Este trabajo se basa en la hipótesis oxidativa de la IC, y tiene como objetivo determinar si existe una relación entre los parámetros clínicos usados para evaluar la IC, y biomarcadores de estrés oxidativo y estrés nitrosativo analizados. Los factores pronósticos no convencionales estudiados son: concentración de tioles reducidos, capacidad antioxidante del plasma, concentración de nitrito y nitrato, y relación dímero/monómero de hemoglobina.

Se observó un aumento en varios de los marcadores de producción sistémica de ROS/RNS en pacientes con una prognosis pobre, como por ejemplo una disminución de la concentración de tioles en el plasma de pacientes con síntomas más graves, y un aumento el de la relación dímero/monómero de Hb con el avance de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

Insuficiencia Cardíaca

La insuficiencia cardíaca (IC) es un síndrome clínico caracterizado por signos y síntomas de sobrecarga de volumen a nivel intravascular y posterior transmisión a nivel del intersticio, que incluyen disnea y edemas de miembros inferiores, así como manifestaciones de perfusión tisular inadecuada, como fatiga y mala tolerancia al ejercicio.[1]

En este síndrome el corazón desarrolla un estado patológico en el que es incapaz de bombear la sangre al ritmo requerido por las necesidades metabólicas del organismo, o solo lo puede lograr bajo presiones patológicamente elevadas. La insuficiencia cardíaca está asociada con un bajo rendimiento cardíaco y excesiva vasoconstricción periférica.

Actualmente, se entiende que la IC es un síndrome clínico altamente complejo que presenta manifestaciones extracardíacas, incluyendo cambios hemodinámicos, neurohormonales y renales que intentan mantener la homeostasis circulatoria. A largo plazo estos cambios son perjudiciales, y resultan en retención excesiva de sodio y fluidos, cambios en el flujo de sangre muscular, patrón de respiración alterado, estado inflamatorio y activación inmune.

La IC es una patología progresiva que se inicia cuando un evento daña el miocardio, resultando en la pérdida de cardiomiocitos, o alternatively, en la disminución de la capacidad del miocardio de generar fuerza, causando que el corazón pierda su contractibilidad normal. Este evento lesional que inicia la IC puede ser abrupto, como en el caso de un infarto al miocardio, puede ser gradual, como en el caso de un aumento de la presión o sobrecarga de volumen, o puede ser hereditario como en el caso de varias cardiopatías genéticas. A pesar de las diferencias, todos estos eventos tienen la característica común de que, de alguna manera, disminuyen la capacidad contráctil del corazón. Luego de este evento se observa un deterioro progresivo de la función contráctil del miocardio (disfunción sistólica).

La disfunción del ventrículo izquierdo (VI) es necesaria pero no suficiente para el desarrollo del síndrome de IC, por lo que los síntomas de IC pueden verse en los pacientes después de transcurrido un tiempo desde el evento dañino inicial, se cree que esto es debido a que los mecanismos compensatorios que se activan al bajar la función cardíaca, logran mantener la función del VI por un periodo variable. Estos mecanismos regulatorios incluyen la activación

del sistema nervioso simpático para retener agua y sales, así como la producción de sustancias vasoconstrictoras como prostaglandinas, péptido natriurético y óxido nítrico (NO*)[2, 3].

Luego del daño al corazón los pacientes pueden permanecer asintomáticos por un período variable de tiempo; la transición a una IC sintomática se da por mayor activación de sistemas neurohormonales y de citoquinas, así como por cambios adaptativos en el miocardio, llamados colectivamente remodelamiento del miocardio.

La importancia de la IC como patología es creciente, puesto que su incidencia y prevalencia está aumentando y es la principal causa de hospitalización de adultos mayores de 65 años. Se trata de la enfermedad que más gastos ocasiona en los países industrializados. A pesar de los avances en el tratamiento, así como en el diagnóstico, el pronóstico de la IC sigue siendo malo, y los pacientes sufren numerosas recaídas y por lo tanto reingresos al hospital.

EPIDEMIOLOGIA

Debido a que la IC se trata de un síndrome clínico, su definición puede ser imprecisa, el diagnóstico del síndrome se debe hacer en base a los signos y síntomas de la IC, combinado con evidencia objetiva de disfunción cardíaca. La ecocardiografía es un método confiable para detectar cambios estructurales y funcionales en el corazón. La cuantificación del grado de disfunción cardíaca se ha hecho en referencia a la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, siendo mayor a 50-60% tomado como normal.

La prevalencia de la IC aumenta significativamente con las décadas de vida, especialmente a partir de los 50 años, el síndrome es raro en individuos menores [4]. La prevalencia general de la IC es de 2%, pero aumenta marcadamente en los adultos mayores[5]. Un estimado muestra que 4 millones de estadounidenses y 6 millones de europeos sufren de IC.

El “Framingham Heart Study”[6], un gran estudio de cohorte realizado en Estados Unidos, mostró que la incidencia de la IC es de 0.2-0.3% en personas de 50-59 años de edad, aumentando 10 veces en los de 80-89 años. Los datos de la población inglesa son similares, con 0.12% de incidencia en el primer rango de edad y un 1.2% en el rango de 80-89 años[7]. La incidencia ajustada por la edad de la IC no ha disminuido en los pasados 20-30 años, a pesar del control de factores causales como infarto agudo de miocardio (IAM), hipertensión y enfermedad coronaria [8]. Debido al envejecimiento de la población, la incidencia no ajustada

a la edad va en aumento, por lo que hay un aumento en las admisiones absolutas, haciendo que la IC siga siendo una carga para los servicios de salud y un costo a la sociedad[9].

En nuestro país, así como en la región, los datos epidemiológicos sobre la IC son escasos e incompletos, pero la IC también es un problema de salud importante; según el Segundo Consenso Uruguayo de IC[1], la prevalencia sería de 17,6/1.000 pacientes asistidos y la incidencia se situaría en 4,6/1.000 pacientes asistidos.

Estudios muestran que 30-40% de los pacientes que sufren IC mueren en el año posterior al diagnóstico y el 60-70% en los 5 años posteriores, debido a disminución de la función cardíaca[10].

ETIOLOGÍA

Las causas de la IC son diversas y multifactoriales. El desarrollo de la IC es usualmente una secuencia lenta de eventos que pueden incorporar varias causas y afectar múltiples órganos.

El síndrome de IC se desarrolla como consecuencia de una anomalía en la estructura, función, ritmo o conducción cardíaca. La mayor parte de los casos de IC son consecuencia del deterioro progresivo de la función contráctil miocárdica y la sobrecarga de presión o de volumen, como ocurre con frecuencia en la lesión isquémica o en la cardiomiopatía dilatada. Otra causa, menos frecuente, es la incapacidad de la cámara cardíaca para relajarse, expandirse y llenarse lo suficiente durante la diástole, aceptando un volumen en sangre ventricular adecuado, como sucede en casos de hipertrofia ventricular izquierda masiva, fibrosis miocárdica, depósito amiloide o pericarditis constrictiva[11].

En países más desarrollados la causa más común es la disfunción ventricular, que resulta principalmente del infarto al miocardio debido a enfermedades coronarias, hipertensión o ambas. Otras causas comunes son cardiomiopatía dilatada, que puede tener base genética o cardiomiopatía alcohólica. En países menos desarrollados, es común que la causa sea la enfermedad valvular reumática, enfermedad de Chagas o fibrosis endomiocárdica.

La hipertensión se ha asociado al desarrollo de insuficiencia cardíaca en varios estudios epidemiológicos. Esta predisposición es causada por varios mecanismos, incluyendo hipertrofia del ventrículo izquierdo, lo que aumenta el riesgo de infarto al miocardio y arritmias. La hipertensión no tratada puede llegar a la dilatación del VI, que en algunos casos puede evolucionar hasta cardiopatía dilatada. De la misma forma, enfermedades valvulares,

congénitas y algunos trastornos que afectan órganos extracardíacos como enfermedad obstructiva crónica pulmonar e hipertiroidismo sin tratar pueden llevar, en último término, al desarrollo de IC.

Los factores de riesgo coronario como la diabetes mellitus y ser fumador son marcadores del desarrollo de fallo cardíaco. El sobrepeso y altos valores de colesterol en plasma también son factores de riesgo para desarrollar insuficiencia cardíaca, esto es debido a sus efectos en las arterias coronarias.

Muchos pacientes portadores de IC tienen comorbilidades relacionadas con el problema cardíaco subyacente de la IC o su causa (ej. angina, hipertensión, diabetes, enfermedad pulmonar) o con la edad. También pueden desarrollarlas debido a la IC (ej. arritmias) o a su tratamiento (ej. gota por los diuréticos). La presencia de estas comorbilidades puede causar la intolerancia a algunas drogas por lo que el manejo de la IC se hace más complejo[10].

FISIOPATOLOGÍA Y PROGRESIÓN

La primera anormalidad que se observa en el corazón que luego desarrollará una IC es la disminución de la función del ventrículo izquierdo, llevando a una disminución del rendimiento cardíaco. Esto desencadena una serie de respuestas fisiológicas compensadoras, que en el corto plazo ayudan a mantener la perfusión normal de los tejidos y mejorar el ambiente mecánico del corazón, pero que a largo plazo son dañinos y cumplen un rol fundamental en el desarrollo de falla cardíaca crónica[2]. En la Figura 1 se muestra un esquema de como los mecanismos compensadores influyen en la progresión de la IC.

El bajo rendimiento cardíaco disminuye la perfusión renal, activando el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), la angiotensina II es un potente vasoconstrictor de la circulación renal y sistémica, y la aldosterona promueve la retención de agua y sal. Este sistema ayuda a mantener el rendimiento cardíaco en el corto plazo, ya que causa vasoconstricción y aumento en el volumen de sangre, pero es perjudicial en el largo plazo, ya que no solo causa síntomas de retención de líquidos, sino que también causa daño adicional al miocardio mediante la fibrosis y apoptosis mediadas principalmente por angiotensina II y aldosterona[12].

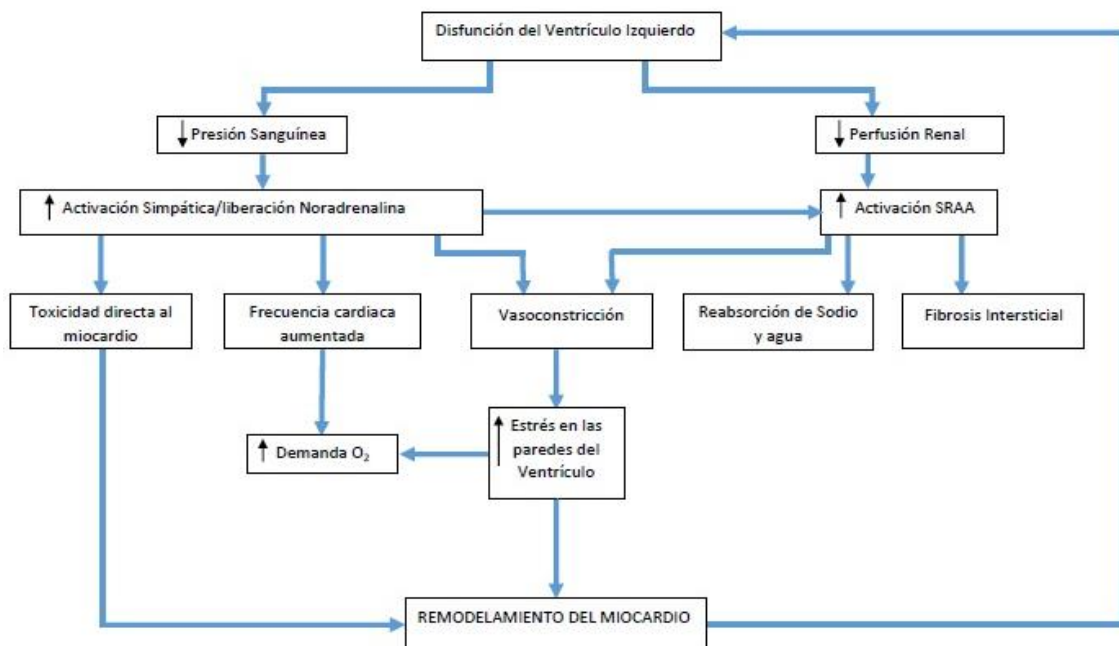


Figura 1. Bases fisiopatológicas de la progresión de la IC.

La reducción en el rendimiento cardíaco también es detectada por baroreceptores, por la disminución de la presión arterial, lo que causa que se active el sistema nervioso simpático (SNS) que aumenta la contractilidad miocárdica, la frecuencia cardíaca, y la vasoconstricción periférica. A largo plazo, esta activación del sistema nervioso simpático (SNS), que aumenta las concentraciones de noradrenalina en sangre, ejerce más estrés en el corazón y acelera el proceso de remodelamiento del miocardio, con dilatación de las paredes del VI [13].

No todas las respuestas neurohormonales son perjudiciales para el corazón. En respuesta a la tensión cardíaca aumentada se secreta más péptido natriurético del tipo B, péptido que actúa para aumentar natriuresis, diuresis y la vasodilatación, por lo tanto contrarrestando la vasoconstricción intensa y la retención de fluidos y sodio causado por otros cambios neurohormonales y hemodinámicos[2].

Modelos experimentales han demostrado que concentraciones fisiopatológicas de neurohormonas son suficientes para reproducir ciertos aspectos similares al fenotipo de IC [14, 15]. Además, el tratamiento con antagonistas de estas neurohormonas lleva a mejoras clínicas en los pacientes con IC. La efectividad de estos antagonistas disminuye o se pierde al avanzar la IC, esto puede ser debido a que la dosis necesaria de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) o bloqueadores β para inhibir completamente el sistema renina-angiotensina causaría efectos secundarios negativos o a la existencia de vías metabólicas alternativas de las neurohormonas que no son inhibidos por los tratamientos

convencionales. Además existen otros sistemas que se activan en la IC que no son antagonizados por las drogas utilizadas.

Por lo tanto, aunque el inicio del proceso patológico es causado por un evento inicial como puede ser un infarto al miocardio, la evolución de la IC es controlada por eventos que pueden estar alejados en el tiempo del evento inicial, como la liberación abundante de neurohormonas y la liberación local de citoquinas proinflamatorias, así como fuerzas mecánicas alteradas incluyendo el aumento del estrés en las paredes de las cámaras. [3].

Durante la progresión de la IC, el corazón cambia su forma y tamaño en respuesta a señales mecánicas y bioquímicas, estos cambios se llaman remodelamiento del miocardio. Este proceso se da por una variedad de mecanismos incluyendo apoptosis, disminución de las fibras de colágeno que mantienen juntos a los cardiomiocitos, hipertrofia de los cardiomiocitos y el aumento de la matriz intersticial. Tanto las fuerzas mecánicas como el estrés aumentado sobre las paredes del corazón, así como neurohormonas y citoquinas estimulan la hipertrofia de los cardiomiocitos[16].

Las vías que determinan si un cardiomiocito sufrirá hipertrofia o iniciará la vía de la muerte programada son muy complejas y están descriptas incompletamente.

La convergencia de hipertrofia y apoptosis de los miocitos, alteraciones del citoesqueleto, y fibrosis reparativa regulan el tamaño, forma y fuerza del corazón, llevando al remodelamiento progresivo y al desarrollo del síndrome de IC.

Remodelamiento del Ventrículo Izquierdo

El remodelamiento progresivo del ventrículo izquierdo está directamente relacionado con el deterioro de la función del mismo y con una evolución clínica desfavorable en pacientes con IC. El remodelamiento del miocardio parece contribuir independientemente a la progresión de la IC. Este proceso impacta en la biología de los cardiomiocitos, en el contenido de cardiomiocitos del miocardio, y en la geometría o arquitectura de la cámara del VI.

Alteraciones en la biología del cardiomiocito

Numerosos estudios han demostrado que el cardiomiocito sufre cambios que pueden contribuir a la pérdida progresiva de la función contráctil, incluyendo disminución en la expresión de la cadena pesada de la α -miosina, pérdida progresiva de los miofilamentos, alteración de las proteínas del citoesqueleto, alteración en el acoplamiento excitación-contracción, y desensibilización a la señalización por β -adrenérgicos. Cuando se han

examinado cardiomiocitos en condiciones experimentales, se ha encontrado que existe un 50% de disminución en el acortamiento de los cardiomiocitos humanos provenientes de un corazón con falla cardíaca respecto a los cardiomiocitos de un corazón sano [17].

La deformación mecánica de la membrana de los cardiomiocitos, que puede suceder al aumentar la presión de llenado del VI, está implicada la expresión génica temprana, síntesis proteica, y aumento de tamaño de las células. Además de las señales mecánicas, los factores neuroendócrinos como la angiotensina II, endotelina I, norepinefrina, están asociados al aumento en el tamaño de los miocitos y a la hipertrofia cardíaca. Citoquinas como el TNF- α son liberadas por el corazón y se relacionan con hipertrofia de los miocitos y con la apoptosis. La expresión aumentada de citoquinas mediadoras de inflamación cardíaca podría contribuir directamente al desarrollo del remodelamiento del miocardio, así como se demostró para SRAA [3].

Alteraciones en el miocardio

Las alteraciones que aparecen en el miocardio incluyen las que ocurren en el volumen de cardiomiocitos, y los cambios en el volumen y la composición de la matriz extracelular. Existe evidencia que muestra que la pérdida progresiva de cardiomiocitos en el miocardio debido a la muerte celular por necrosis y apoptosis, contribuye a la disfunción cardíaca y al remodelamiento del VI observada en la IC.

Existen cambios importantes que se observan en la matriz extracelular del miocardio como el desarrollo de fibrosis perivascular, así como el excesivo depósito de colágeno que ocurre luego de la muerte de los cardiomiocitos. Se ha probado que la angiotensina II, la aldosterona y la endotelina son suficientes para provocar una fibrosis excesiva en el tejido miocárdico, lo que da un fundamento bioquímico al desarrollo de la fibrosis en la IC[18]. La fibrosis del miocardio puede explicar parte de la progresiva disminución de la función contráctil que ocurre en la falla cardíaca.

Durante el remodelamiento del miocardio ocurre una dilatación progresiva del VI, se ha sugerido que esto se puede explicar en parte por la activación de las matriz metaloproteinasas que ocurre en la IC, estas enzimas lisan el colágeno, degradando la matriz extracelular y causando el reordenamiento de grupos de cardiomiocitos en la pared del VI, la disminución del grosor de la misma y la dilatación del VI que se observa en la IC[3].

Alteraciones en la geometría de la cámara ventricular

Los cambios que ocurren en la biología de los cardiomiocitos y en el miocardio contribuyen al desarrollo de dilatación del VI y la disfunción del mismo que ocurre durante el proceso de remodelamiento, además se encontraron evidencias que las alteraciones en la geometría del VI contribuyen al agravamiento de la IC.

El corazón, luego del proceso de remodelamiento, tiene mayor tamaño y una forma más esférica. Esto crea cargas mecánicas para el corazón, ya que aumenta el volumen diastólico y en consecuencia el estrés en la pared al final de la diástole, lo que aumenta el trabajo del ventrículo y el consumo de oxígeno. Esto, junto con la disminución del grosor de la pared del ventrículo izquierdo, disminuye el rendimiento cardíaco. El aumento en el estrés sobre la pared del VI lleva a la expresión sostenida de genes activados por estiramiento como el de Ang II, TNF y endotelina y a un aumento del estrés oxidativo por hipoperfusión[17].

FACTORES DIAGNOSTICO CONVENCIONALES EN INSUFICIENCIA CARDIACA

FRACCIÓN DE EYECCIÓN DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO (FEVI)

La fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) es la relación entre el volumen sistólico total y el volumen diastólico final; mediante este indicador, expresado en porcentaje, se mide la disminución del volumen del ventrículo izquierdo del corazón en sístole, con respecto a la diástole. En un ventrículo izquierdo normal la fracción de eyección es mayor de 55%.

Una FEVI del 45-50% indica que el corazón está sólo un poco más débil de lo normal (disfunción ventricular izquierda leve). Entre el 35-45% hablamos de disfunción moderada del ventrículo izquierdo. Y menos del 35% es ya una disfunción severa del ventrículo izquierdo; estos son los corazones más disfuncionales.

Varios estudios clínicos han mostrado que la medida de la FEVI es de los predictores más precisos del diagnóstico en pacientes con IC. Sin embargo, la correlación entre la FEVI y la tolerancia al esfuerzo es escasa, por lo que un paciente con una FEVI del 20% (severamente disminuida) puede estar asintomático, mientras que otro paciente con una FEVI del 45% (disfunción sólo leve) puede presentar síntomas muy marcados de insuficiencia cardiaca[19].

La ecocardiografía es el método más comúnmente utilizado para valorar la función ventricular. Permite valorar, además de la FEVI, el grado de dilatación ventricular, el grosor de las paredes, movimientos anormales en las paredes y septos, presencia de trombos, obstrucción de tractos de salida del flujo sanguíneo y tracto pericárdico.

La determinación de la función ventricular izquierda es fundamental en el manejo de los pacientes de IC. La historia, el examen físico, la radiografía de tórax y el ECG muchas veces no permiten distinguir entre disfunción sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo (FEVI >40%). Igualmente, la radiografía de tórax debe realizarse ya que en esta se puede observar la presencia de cardiomegalia, que en pacientes sintomáticos es altamente sugestiva de IC. Por otro lado, la radiografía puede ayudar a distinguir la IC de otras causas de disnea, como afecciones pulmonares y valvulopatías calcificadas. También debe realizarse un electrocardiograma, pues puede mostrar elementos de isquemia, arritmia, infarto previo, hipertrofia ventricular izquierda y trastornos de la conducción, aunque estos cambios sean inespecíficos[20].

CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LA NEW YORK HEART ASSOCIATION

La congestión y edema pulmonares presentes en la IC determinan la disminución de los volúmenes aéreos y de la distensibilidad pulmonar llevando a una alteración ventilatoria restrictiva. Esta es proporcional a la severidad de la IC y mejora con el tratamiento. Estas alteraciones incrementan el trabajo respiratorio y deterioran el intercambio gaseoso, lo que, sumado a la disminución de las fuerzas musculares respiratorias y esqueléticas, produce disnea y fatiga, síntomas característicos de la IC.

La clasificación comúnmente utilizada para cuantificar el grado de limitación funcional impuesta por la IC fue inicialmente desarrollada por la New York Heart Association (NYHA). Esta clasificación establece cuatro categorías, que se muestran en la Tabla 1, en base a cómo la IC afecta a la actividad física del paciente.

La clasificación funcional tiene un importante valor pronóstico y se utiliza como criterio decisivo en la elección de determinadas intervenciones terapéuticas, tanto médicas como quirúrgicas. La evaluación periódica de la clase funcional permite seguir la evolución y la respuesta al tratamiento.

La clasificación de la NYHA puede ser detallada de la siguiente manera: clase I y II corresponde a una IC leve, la clase III a moderada y la clase IV a una IC severa. Para una IC clase I, no hay limitación en la actividad física, ya que la actividad física regular, no causa, fatiga o falta de aliento. Cuando un paciente está atravesando una IC clase II, la actividad física es levemente limitada ya que la actividad física común, causa fatiga o disnea. Cuando la IC es clase III, existe una limitación significativa de la actividad física, ya que actividad física ligera puede causar fatiga y dificultades respiratorias. Cuando un paciente sufre IC severa, es decir clase IV, es incapaz de realizar cualquier actividad física ya que causaría malestar y dolor [21].

Clase funcional I	Actividad ordinaria sin síntomas. No hay limitación de la actividad física.
Clase funcional II	El paciente tolera la actividad ordinaria, pero existe una ligera limitación de la actividad física, apareciendo disnea con esfuerzos intensos.
Clase funcional III	La actividad física que el paciente puede realizar es inferior a la ordinaria, está notablemente limitado por la disnea.
Clase funcional IV	El paciente tiene disnea al menor esfuerzo o en reposo, y es incapaz de realizar cualquier actividad física

Tabla 1. Clasificación de la insuficiencia cardiaca según la NYHA.

ESTRÉS OXIDATIVO Y ESPECIES REACTIVAS

La mayoría del oxígeno utilizado en la célula se reduce completamente a agua por 4 electrones en la mitocondria, pero también puede ocurrir la reducción parcial en procesos tanto fisiológicos como patológicos, lo que produce especies con mayor reactividad que el oxígeno molecular, las llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS por su sigla en inglés)[22].

Las ROS son definidas como moléculas derivadas del oxígeno con inestabilidad y reactividad química característica. Existen varias formas reactivas del oxígeno, algunos son radicales libres como el superóxido y el radical hidroxilo, y otras son formas no radicales como el peróxido de hidrogeno. Los radicales libres son moléculas que tienen un electrón desapareado, esto les otorga una reactividad e inestabilidad característica. Los ROS son formados por el metabolismo aeróbico normal en la mitocondria por fuga de electrones y por el metabolismo enzimático de sustratos endógenos y exógenos.

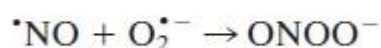
En condiciones fisiológicas, bajos niveles de ROS y especies reactivas del nitrógeno (RNS) cumplen varias funciones en la mayoría de los órganos y sistemas, como defensa del huésped, inflamación, activación de factores de transcripción, señalización celular, crecimiento celular, senescencia y muerte, y sensores del nivel de oxígeno. Pero si la generación de especies reactivas aumenta sin ser removidas eficientemente, éstas se acumulan, y el exceso de las mismas es perjudicial no solo por el daño oxidativo no específico que causan al ADN, proteínas, lípidos y otras macromoléculas, sino también desregulando cascadas de señalización redox, llevando eventualmente a disfunciones celulares y de órganos, así como a muerte celular. Este desbalance se conoce como estado de estrés oxidativo. La modificación de moléculas celulares, como proteínas, por los ROS se denomina daño oxidativo. En las células existen defensas antioxidantes, tanto enzimáticas como no enzimáticas, como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa, vitamina E, vitamina C, entre otras, para proteger a la célula del daño oxidativo.

ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS)

La especie reactiva del oxígeno producida primariamente en las células es el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), por reducción por un electrón del oxígeno, que se genera como producto secundario en la cadena de transporte de electrones[23], así como en otras reacciones catalizadas por enzimas citosólicas y mitocondriales (NADPH oxidasa, XO, MAO, entre otras). El superóxido es transformado a peróxido de hidrogeno (H_2O_2) por superóxido dismutasas (SODs), enzimas

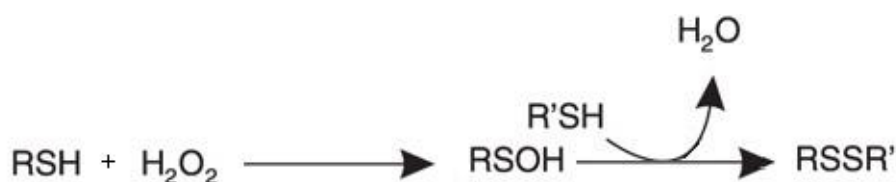
antioxidantes que se encuentran tanto en la mitocondria como en el citosol. Esta especie puede difundir más fácilmente en la célula ya que es neutra, más estable y permeable en membranas.

El superóxido puede inducir efectos dañinos por su reacción con $\cdot\text{NO}$ que genera peroxinitrito (Ecuación 1)[24], un oxidante biológico fuerte, además de ser altamente reactivo con especies que contienen metales de transición, por ejemplo oxidando clusters de hierro azufre.



Ecuación 1. Formación de peroxinitrito por reacción del óxido nítrico y superóxido

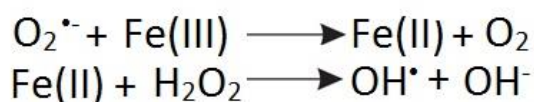
El H_2O_2 es un metabolito celular normal, producido constantemente en las células, y su concentración se mantiene baja por acción de las peroxidasas. La reactividad del H_2O_2 con la mayoría de las biomoléculas es relativamente baja, la mayoría de los efectos perjudiciales del peróxido son causados por su reacción con metales de transición y enzimas. Las proteínas que contienen tioles son vulnerables a la oxidación por H_2O_2 , su oxidación reversible a disulfuros o ácido sulfénico, reacción que se observa en la Ecuación 2, controla las funciones biológicas de varias maneras. Se pueden alterar químicamente cisteínas pertenecientes al sitio activo, alterar interacciones intermoleculares, o regular la actividad por modificación de cisteínas alostéricas. Entonces la función de estas proteínas puede ser regulada por el H_2O_2 , lo que constituye un mecanismo de señalización redox. Cuando las concentraciones de H_2O_2 aumentan por sobre el nivel normal, se produce un desbalance en estas vías de señalización.



Ecuación 2. Oxidación de toles mediada por el H_2O_2

El H_2O_2 producido en la mitocondria puede ser eliminado por enzimas mitocondriales o difundir a través de la membrana hacia el citosol donde puede ser removido por los sistemas antioxidantes citosólicos. Cuando no es metabolizado por los sistemas antioxidantes de la mitocondria, el H_2O_2 puede generar, por escisión reductiva, el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) a través

de la reacción de Fenton, que se muestra en la Ecuación 3, catalizada por metales de transición. Las células tienen mecanismos para que no haya metales de transición libres, pero en condiciones de estrés, el superóxido puede reaccionar con los grupos prostéticos metálicos de las enzimas, liberándolos al medio, donde están disponibles para catalizar la reacción de Fenton. El radical hidroxilo es el oxidante más potente producido en sistemas biológicos, reacciona rápida e indiscriminadamente con la mayoría de las biomoléculas presentes en el sitio de su formación, por lo que su formación a nivel celular es esencialmente perjudicial [25].



Ecuación 3. Formación del radical hidroxilo mediante reacción de Fenton

Otra ROS altamente reactiva que se ha empezado a estudiar en los últimos años es el radical carbonato. La formación de este radical se demostró directamente en mezclas de peroxinitrito y bicarbonato, y se propone que se forme en varias condiciones biológicamente relevantes [26]. Debido a que el bicarbonato está presente en sistemas biológicos en concentraciones milimolares, es razonable que el $\text{CO}_3^{\bullet-}$ tenga implicaciones biológicas.

El $\text{CO}_3^{\bullet-}$ es un fuerte oxidante de un electrón, que al estar cargado es un agente oxidante importante en medios acuosos, donde su blanco más importante es el GSH, también oxida residuos aminoácidos expuestos al solvente en proteínas, en especial Tyr, Trp, y Cys. Como este radical oxida las biomoléculas a radicales, sus efectos no son discriminados fácilmente de otros oxidantes de un electrón, esto contribuye a que este radical no se haya estudiado de forma significativa [27]

ESPECIES REACTIVAS DEL NITRÓGENO

Las especies reactivas del nitrógeno son el óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$) y sus derivados, los que incluyen especies radicalares como el dióxido de nitrógeno radical, y especies no radicalares como el peroxinitrito. Estas especies pueden promover reacciones de oxidación, nitrosación y nitración, cada una de ellas tiene distintos blancos biológicos y reaccionan de diferente forma con ellos.

El $\text{NO}^{\bullet}$ es un mensajero intracelular que media varios procesos fisiológicos como neurotransmisión, vasodilatación, respuesta inmune y agregación plaquetaria. La producción

de GMP cíclico es el principal mecanismo de transducción de señales utilizado por este mensajero. Además de su rol fisiológico como transductor de señales, el $\text{NO}^\bullet$ puede tener un rol citotóxico y ser un mediador patológico cuando es producido en tasas altas por la iNOS o cuando se sobrestimulan las formas constitutiva. El $\text{NO}^\bullet$ es un radical relativamente estable y no es un oxidante fuerte, la mayoría de la toxicidad mediada por $\text{NO}^\bullet$ se da en el contexto de estrés oxidativo debido a la formación de derivados del $\text{NO}^\bullet$ que son más reactivos que éste. Debido a su naturaleza neutra e hidrofóbica, el $\text{NO}^\bullet$ puede difundir y concentrarse en membranas, lo que junto con su pequeño tamaño es importante para su rol como mensajero celular [28].

Las principales reacciones biológicamente relevantes del $\text{NO}^\bullet$ son con el superóxido para formar peroxinitrito y la formación de complejos nitrosilo con metales de transición o aductos nitroso con biomoléculas. Las reacciones del $\text{NO}^\bullet$ pueden resultar tanto en actividad oxidante como antioxidantes ya que puede reaccionar con otros radicales para dar especies más oxidantes y tóxicas como el peroxinitrito o puede terminar reacciones de propagación como en el proceso de peroxidación de lípidos [29].

El peroxinitrito (ONOO^-) es un oxidante muy fuerte formado por la reacción controlada por difusión entre el $\text{NO}^\bullet$ y el $\text{O}_2^{\bullet-}$. Este oxidante se vuelve importante en contexto de producción aumentada de $\text{O}_2^{\bullet-}$, y ha sido implicado en la patofisiología de numerosas enfermedades. La producción de peroxinitrito parece estar acotada a los lugares de producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$, ya que aunque el $\text{NO}^\bullet$ difunde a través de las membranas, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ no es capaz de hacerlo [30]. El peroxinitrito y su forma ácida, el ácido peroxinitroso, pueden participar directamente en reacción de oxidación por uno o dos electrones. Aunque tiene una vida media corta, es suficiente para que difunda a través de membranas, en una distancia de uno o dos diámetros celulares. Muchas biomoléculas son oxidadas o nitradas por los radicales derivados del peroxinitrito, incluyendo residuos tirosina, tioles, ADN, y fosfolípidos que contienen ácidos grasos insaturados. El ONOO^- puede reaccionar directamente con los tioles, causando su oxidación a derivados sulfénicos que pueden derivar en disulfuros. También puede reaccionar directamente con centros de metales de transición, en reacciones de oxidación por un electrón. Otra de las reacciones importantes del peroxinitrito es su combinación con CO_2 para dar $\text{CO}_3^{\bullet-}$ y $\text{NO}_2^\bullet$, oxidantes de un electrón que median varios procesos nitrooxidativos. El $\text{NO}_2^\bullet$ puede sufrir reacciones radical-radical de terminación con biomoléculas para dar productos nitrados. El ONOOH puede sufrir un proceso de fisión homolítica, que genera el radical hidroxilo y $\text{NO}_2^\bullet$ [24].

Existen interacciones entre las ROS y las RNS, además de las reacciones directas, como la del $\cdot\text{NO}$ y el $\text{O}_2^{\cdot-}$, existe una modulación de la producción de ROS vía las RNS, por ejemplo el $\cdot\text{NO}$ inhibe la citocromo c oxidasa, aumentando la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por la cadena de transporte de electrones. Además la existencia de dianas celulares comunes causa que sea posible inhibir la acción de especies reactivas, por ejemplo las ROS pueden oxidar tioles que son blanco de nitrosación por $\cdot\text{NO}$.

ESTRÉS OXIDATIVO

El concepto de estrés oxidativo ha evolucionado desde su primera definición, en la que era percibido como negativo y solamente patológico. En el presente se entiende que las ROS y las RNS que causan el estrés oxidativo no están involucradas únicamente en procesos patológicos sino que sirven como señalizadores en diversas circunstancias.

La definición más reciente de estrés oxidativo es “un desbalance entre los oxidantes y antioxidantes en favor de los oxidantes, que lleva a una alteración de la señalización y control redox/o a daño oxidativo molecular”[31, 32].

El estrés oxidativo ocurre cuando hay un desequilibrio entre las especies oxidantes y las defensas antioxidantes, esto puede ocurrir cuando existe una mayor producción de ROS o si las defensas antioxidantes están comprometidas. Este estado, resulta del metabolismo que utiliza O_2 y representa un desequilibrio entre las reacciones prooxidantes y antioxidantes en el organismo.

Debido a la capacidad de las ROS y RNS de causar daño a biomoléculas y de regular vías de señalización, el estrés oxidativo se ha asociado a varias patologías y al proceso de envejecimiento.[33, 34] El balance entre los aspectos perjudiciales y beneficiosos de las especies reactivas se denomina regulación redox, y en condiciones normales, protege a las células del estrés oxidativo, manteniendo la homeostasis redox.

HIPOTESIS OXIDATIVA DE LA IC

Muchos estados patológicos han sido asociados con un aumento en las especies reactivas del oxígeno, desde el envejecimiento hasta cáncer y enfermedades cardíacas [33, 35, 36].

La hipótesis oxidativa de la IC propone que la misma se caracteriza por un estado de estrés oxidativo generalizado y específico del corazón, y que la misma injuria oxidativa crónica contribuye a la falla del miocardio[37], ya que los ROS estarían implicados en procesos como la hipertrofia, apoptosis y remodelamiento del miocardio, la influencia de las especies reactivas en el desarrollo y progresión de la IC se esquematiza en la Figura 2.

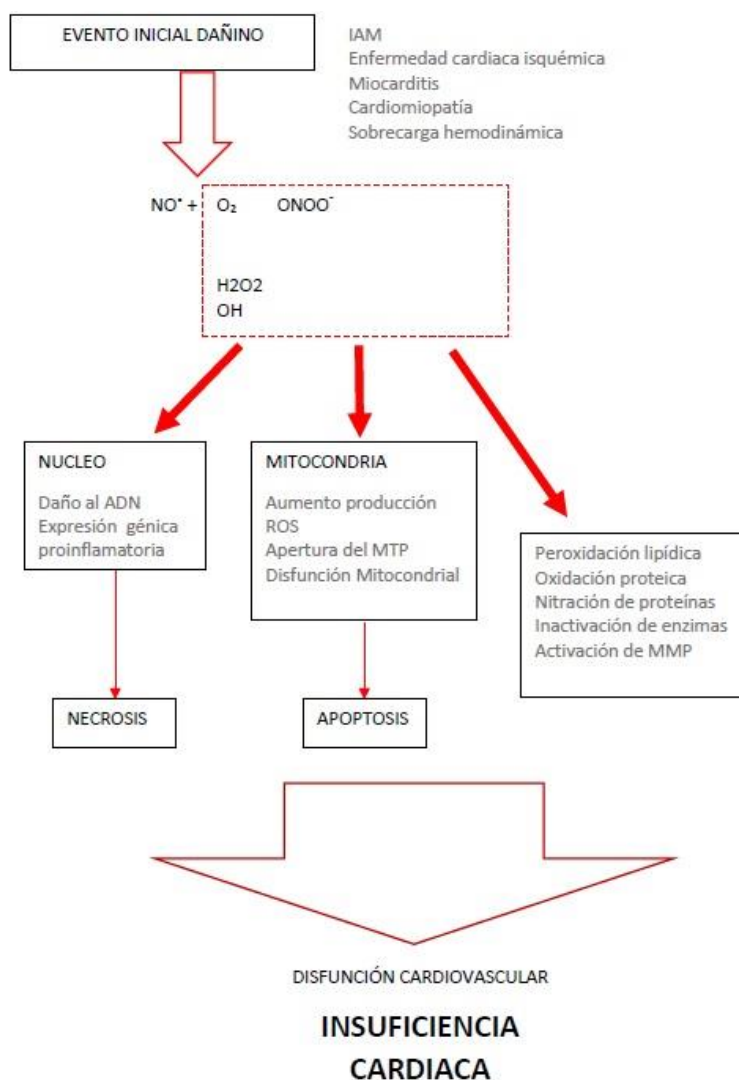


Figura 2. Esquema de los efectos de las especies reactivas en el desarrollo y progresión de la IC.

Existe un número significativo de estudios *in vitro* e *in vivo* que han demostrado la formación de ROS en el sistema cardiovascular en respuesta a varios factores de estrés, así como en el corazón disfuncional [38]. Experimentos *in vitro* han demostrado que la excesiva producción de ROS y/o el deterioro de las defensas antioxidantes afectan adversamente a varias funciones de los miocitos, disminuye la contractilidad del miocardio, causa daño al músculo cardíaco y puede provocar la apoptosis de los cardiomiocitos [39]. Además, modelos animales *in vivo* mostraron el efecto de la injuria oxidativa sobre la función cardíaca y mostraron un posible rol

del estrés oxidativo en la IC [40, 41]. Por ejemplo, la sobreexpresión transgénica de la superóxido dismutasa reduce el área de infarto en ratones, lo que respalda la afirmación de que las ROS son mediadores importantes del daño al miocardio en IAM.

Ratones que sobreexpresan la enzima antioxidante endógena glutatión peroxidasa tienen disminuido el desarrollo de dilatación de VI, disfunción y muerte tras un IAM[42]. Además, estudios realizados con resonancia electroparamagnética con spintrap demostraron directamente un aumento en los niveles de $O_2^{\bullet -}$ en el corazón disfuncional[43].

Se han realizado estudios en pacientes que sufren de IC que apoyan la hipótesis oxidativa, ya que se observa un aumento de marcadores de estrés oxidativo[38, 44, 45], y se ha visto un aumento en la actividad NADPH oxidasa del miocardio en pacientes con IC avanzada[46]. Además un ensayo clínico que estudio la inhibición de la xantina oxidasa, posible fuente de ROS en la IC, mostró un aumento de la FEVI luego de ser tratados con oxipurinol en pacientes con una FEVI inicial menor a 40 [47].

La significancia biológica de esta hipótesis ha sido establecida por la extensa evidencia en modelos no humanos, aunque todavía falta un estudio epidemiológico importante en pacientes que encuentre un nexo claro entre el estrés oxidativo y la enfermedad. Sin embargo, en estudios de tamaño reducido se ha observado una relación entre la insuficiencia cardiaca y marcadores de un estado de estrés oxidativo, y existen patologías específicas en las que se ha determinado de forma clara, obteniendo el mecanismo que explica el rol del estrés oxidativo [37].

FUENTES DE ESPECIES REACTIVAS EN IC

La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en el contexto de una Insuficiencia cardiaca puede ocurrir en varios tipos celulares como cardiomiocitos, células endoteliales, células de músculo liso vascular, fibroblastos y células inflamatorias[48].

Existe una fuerte conexión entre el metabolismo cardiaco y la generación de ROS, ya que vías metabólicas básicas que se dan en el corazón son reguladas por ROS.

Las ROS producidas en el corazón, es decir que podrían estar involucrados en la patofisiología de la IC, pueden ser de fuente citosólica o mitocondrial:

FUENTES CITOSOLICAS

NADPH oxidasa

Las NADPH oxidasas son de las principales fuentes celulares de ROS que parecen tener relevancia en muchos procesos fisiológicos y patológicos en el corazón, como hipertrofia y apoptosis. La NADPH oxidasas son una fuente celular importante de $O_2^{\bullet-}$ y existen evidencias de que estas enzimas producen ROS que están involucrados en la señalización redox [49].

Existen varias isoformas de las NADPH oxidasas que se diferencian en varias de sus características, y parecen jugar papeles diferentes tanto en la patofisiología general del corazón, así como específicamente en la IC. Cada uno de los miembros de la familia de las Nox está basado en una subunidad catalítica distinta y tienen diferentes requerimientos de otras subunidades proteicas.

De la familia de las Nox, la Nox2 y Nox4 son de las que existe mayor información sobre expresión y función en los cardiomiocitos. Las dos isoformas son proteínas unidas a membrana pero existen varias diferencias entre ellas. Nox2 es una enzima que se encuentra inactiva en condiciones basales y es activada de forma aguda por estímulos como angiotensina II, endotelina I, factores de crecimiento y citoquinas en un proceso regulado. Subunidades regulatorias citoplasmáticas se deben unir a la subunidad de membrana para iniciar la actividad enzimática. En cambio Nox4 no necesita subunidades regulatorias, tiene una actividad basal baja y parece ser regulada por los niveles de expresión, es decir la abundancia de la proteína[50].

Existe una controversia sobre que especie reactiva es la que produce mayoritariamente la Nox4, varios trabajos de grupos independientes reportan que produce H_2O_2 mientras que

otros sugieren que, al igual que la Nox2, produce superóxido que luego dismuta a H_2O_2 . Dado que solo el superóxido reacciona con el $\cdot NO$ y que existen resultados que sugieren que el peróxido hasta podría activar la eNOS, esta diferencia entre la Nox4 y otras Nox puede ser de gran importancia.

La localización de Nox2 y Nox4 en los cardiomiocitos es distinta; mientras que la Nox2 se encuentra predominantemente en la membrana plasmática, Nox4 parece localizarse en estructuras membranosas intracelulares. Su localización exacta permanece controversial, se piensa que está localizada en la región perinuclear incluyendo retículo endoplasmático y/o mitocondrias de cardiomiocitos[49].

Muchas líneas de investigación in vivo e in vitro han demostrado que Nox2 y Nox4 cumplen un rol importante en la patogénesis del remodelamiento cardíaco.

Muchos estudios apoyan un rol fisiopatológico de la Nox2 en las enfermedades cardiovasculares, lo que parece estar en concordancia con el hecho de que muchos factores de estrés para el corazón inducen la activación de esta isoforma[51]. Aunque no se tiene claro los mecanismos, la Nox2 contribuye al desarrollo de la hipertrofia cardíaca inducida por Ang II, de fibrosis intersticial, disfunción contráctil, y apoptosis en la remodelación cardíaca o cuando existe sobrecarga de presión[52]. Es claro que ROS derivados de la Nox2 modulan varias vías de señalización redox en los cardiomiocitos.

Se sabe mucho menos de la función de la Nox 4 en el corazón, existen reportes que su sobreexpresión en respuesta a la sobrecarga de presión crónica está acompañada de disminución de la función del VI, aumento de la apoptosis y fibrosis en edad avanzada pero también hay estudios que muestran que la Nox 4 puede ser cardioprotectora en la respuesta a la sobrecarga de presión crónica[53].

Xantina oxidasa

Esta enzima es otra fuente crítica de generación de ROS en los cardiomiocitos. En condiciones fisiológicas normales, XO existe como xantina dehidrogenasa (XDH) que puede ser convertida en xantina oxidasa por proteólisis limitada u oxidación de grupos sulfihidrilos. La xantina oxidasa produce tanto superóxido como H_2O_2 mediante la hidroxilación oxidativa catalítica de sustratos purínicos. El peróxido, en presencia de metales como hierro puede ser convertido en hidroxilo radical, especie altamente reactiva. La localización subcelular de XO es controversial y está descripta incompletamente, pero parece estar ubicada en el citoplasma de los cardiomiocitos[54].

Las ROS generadas por la XO se han implicado en daño estructural e interferencia en vías de señalización celular. El inhibidor de la XO, alopurinol, es efectivo atenuando el desacoplamiento mecanoenergético que ocurre en la IC[55]. El superóxido generado por esta enzima parece interferir con la regulación vía NO de la energética miocárdica. La interacción normal de la XO y la NOS puede estar alterada en IC porque la abundancia de XO en el miocardio disfuncional está aumentada. En el corazón normal, la actividad XO es baja, ya que esta enzima se encuentra en forma inactiva, pero podría activarse y producir ROS en ciertas condiciones[54].

Se ha observado aumento de la actividad XO en modelos experimentales de falla cardiaca y pacientes en las últimas etapas de IC, y su inhibición ha mostrado ser beneficiosa en modelos de IC [47, 56], mejorando la eficiencia mecánica y el remodelamiento cardiaco.

La XO se encuentra de forma más significativa en el endotelio vascular y en macrófagos y monocitos, por lo que los ROS producidos por esta enzima en dichos tipos celulares podrían ser de importancia para los efectos de la activación de la XO en la IC y otras patologías cardíacas.

Óxido nítrico sintasa

Las Óxido Nítrico Sintetas (NOS) producen NO a partir de L-arginina, O_2 y NADPH, utilizando FAD, FMN y tetrahidrobiopterina como cofactores (Figura 3). Existen 3 isoformas de la NOS, NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) y NOS inducible (iNOS); a pesar de sus nombres estas enzimas son expresadas en un amplio espectro de tejidos de mamíferos[57]. Esta enzima puede estar localizada en varios compartimentos subcelulares de los cardiomiocitos y modula la función cardíaca.

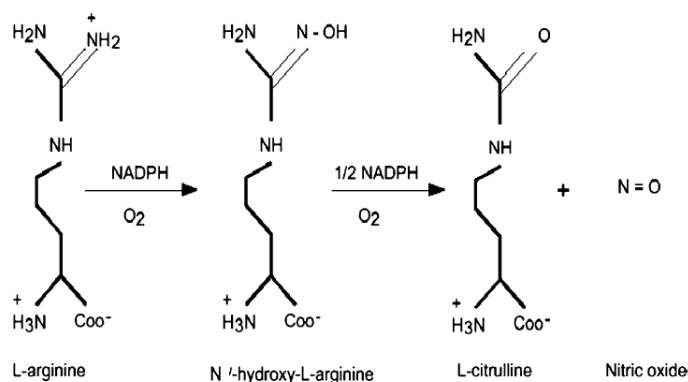


Figura 3. Biosíntesis del óxido nítrico, reacción catalizada por la NOS. Extraída de [52].

La eNOS y la nNOS son expresadas constitutivamente y producen bajos flujos de *NO en respuesta a aumentos en la concentración de calcio intracelular, en cambio la iNOS es expresada en respuesta a estímulos como citoquinas, y produce flujos mayores de *NO . Los cardiomiocitos expresan constitutivamente tanto la eNOS como la nNOS. La iNOS no se encuentra en el miocardio sano pero su expresión puede ser inducida por mediadores proinflamatorios[58].

Las NOSs pueden desacoplarse y generar superóxido en condiciones donde hay deficiencia de su cofactor esencial tetrahidrobiopterina (BH_4), que puede ser degradado por ROS, por lo que la producción de superóxido por esta enzima puede funcionar como un amplificador de las acciones de las ROS, tanto de las perjudiciales como las de señalización. El desacoplamiento de la NOS involucra el dominio oxigenasa y la disociación de un complejo ferroso dioxígeno que normalmente es estabilizado por la tetrahidrobiopterina. La producción de *NO y superóxido por la NOS desacoplada, se asocia a la formación de peroxinitrito. Se ha observado una mayor expresión y actividad de la iNOS en falla cardíaca experimental y humana, por lo que la inhibición de iNOS puede beneficiar a la función cardíaca. La hipótesis principal es que la mayor actividad de la iNOS contribuye a la mala adaptación cardíaca[59].

La nitrosilación de residuos de cisteína en las proteínas podría modular cascadas de transducción de señales en un modo análogo al de la oxidación de estos residuos[60].

FUENTES MITOCONDRIALES

El corazón, debido a su gran demanda de ATP, tiene el consumo de oxígeno más alto del cuerpo. Para cubrir sus altas necesidades de energía, los cardiomiocitos son las células con mayor densidad de mitocondrias en el cuerpo y depende estrechamente de la energía generada en este organelo para su correcto funcionamiento[61].

Los ROS son derivados normales de la cadena respiratoria, en condiciones fisiológicas la cantidad de ROS producida es muy baja y son eliminados por los sistemas antioxidantes de la mitocondria, sin embargo este balance se rompe en varias condiciones fisiopatológicas.

La ROS producida primariamente en la mitocondria es el $O_2^{\bullet-}$, ya que aunque la mayoría del oxígeno es reducido a H_2O por la transferencia de 4 electrones, también se produce una pequeña cantidad de $O_2^{\bullet-}$, por una reducción monoelectrónica. Los principales lugares de producción de $O_2^{\bullet-}$ se esquematizan en la Figura 4. Este radical es, en general, transformado a H_2O_2 por la acción de enzimas de la matriz como la MnSOD y la CuZnSOD del espacio intermembrana. La abundancia de las superoxido dismutasas, así como su presencia en ambos compartimentos, muestra la importancia de remover el $O_2^{\bullet-}$ producido en la mitocondria. El H_2O_2 no eliminado puede producir radical hidroxilo, altamente oxidante, por lo que la mitocondria tiene mecanismos eficientes para remover el H_2O_2 , así como sistemas quelantes de metales [25].

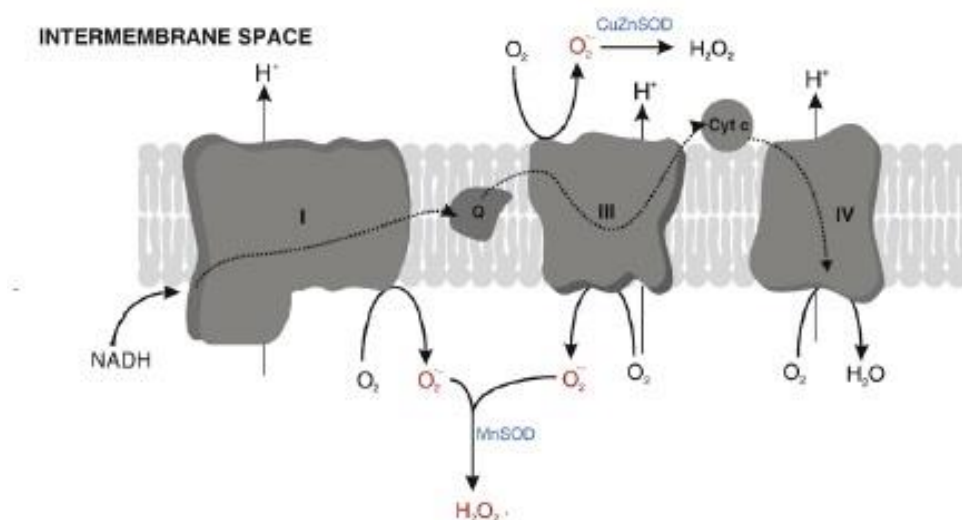


Figura 4. Principales sitios de producción de $O_2^{\bullet-}$ en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Extraído y modificado de [25].

Entonces, las mitocondrias son una fuente constante de especies reactivas del oxígeno como consecuencia del metabolismo aerobio normal. Debido a esto, estas especies se podrían producir a tasas más altas que las del citosol, dependiendo de las condiciones metabólicas, siendo asociadas generalmente a procesos perjudiciales, aunque existen excepciones. El $O_2^{\bullet-}$ es producido principalmente en el complejo I y II de la cadena de transporte de electrones por fuga de electrones en el proceso de respiración mitocondrial. Tanto el complejo I como el complejo III son fuentes importantes de ROS en los cardiomiocitos[43, 62].

Es importante destacar que el nivel de ROS de la mitocondria no solo depende de la tasa de producción de estas especies en la cadena respiratoria, sino que también está afectado por los sistemas antioxidantes de este organelo.

La relación exacta entre el flujo de electrones en la cadena respiratoria, el potencial de membrana, la producción de ROS en la mitocondria y su aumento en ciertas condiciones, todavía permanece controversial. Aunque se ha sugerido que en condiciones donde la cadena de transporte de electrones se encuentra altamente reducida, como en la hipoxia, el bajo flujo de electrones se ve acompañado por un aumento en la producción de ROS. Igualmente la generación de ROS también se puede ver aumentada cuando la cadena de transporte electrónico está altamente oxidada como en una sobrecarga de trabajo en la falla cardíaca.

Cuando la producción de ROS por la mitocondria es baja, puede ser beneficiosa, como en el preacondicionamiento isquémico, en cambio cuando la generación de ROS aumenta es perjudicial y puede causar daños al ADNmt y a las proteínas mitocondriales.

Evidencia significativa de la implicancia de los ROS mitocondriales en enfermedades cardíacas provienen del estudio de ratones en los que se ha modificado los niveles de antioxidantes mitocondriales; ratones con delección de la MnSOD desarrollan una falla cardíaca progresiva[63], mientras que los que sobreexpresan enzimas antioxidantes como la Prx 3 y la glutatión peroxidasa muestran una disminución en el remodelamiento adverso que se da luego de un IAM[64]. Las enfermedades cardiovasculares se han encontrado asociadas a anomalías en la estructura y función de la mitocondria cada vez con más frecuencia.

En el miocardio disfuncional, existe una disminución de la actividad del complejo I lo que baja la capacidad de transferencia de electrones, causando una producción aumentada de ROS en la IC. Esta pérdida de actividad se puede deber al ataque de las ROS, la mitocondria como mayor productora de estas especies también puede ser el principal blanco de acción de las mismas.

Más recientemente se ha postulado que el daño al ADNmt y los defectos en la transcripción y/o replicación de los genes mitocondriales estén involucrados en la insuficiencia cardíaca. En efecto, IC está frecuentemente asociado con defectos cuantitativos y cualitativos en el ADNmt. Existen resultados que muestran el importante rol que juega el decaimiento de la función mitocondrial y del número de copias de ADNmt en el desarrollo de insuficiencia cardíaca que ocurre luego de IAM. La actividad enzimática de los complejos I, III y IV disminuyen en la falla cardíaca, mientras que no se observa una disminución en la actividad enzimática del complejo II, ni de la citrato sintasa, las cuales son codificadas exclusivamente por el ADN nuclear[61, 65].

La disfunción de la mitocondria está asociada a un aumento en la producción de ROS, que puede llevar a un ciclo catastrófico de decaimiento funcional, aumento en producción de ROS e injuria celular.

Se pueden producir ROS en la mitocondria en otros sitios además de la membrana mitocondrial interna, por ejemplo por la monoamina oxidasa. Estas flavoenzimas están localizadas en la membrana mitocondrial externa, y catalizan la desaminación oxidativa de catecolaminas y aminos biogénicas. En este proceso las MAOs generan H_2O_2 y por eso pueden contribuir al estrés oxidativo en el corazón[25].

DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN EL CORAZÓN

Los antioxidantes son sustancias que en bajas concentraciones inhiben o disminuyen significativamente la oxidación de sustratos oxidables. El rol fisiológico de los antioxidantes es prevenir el daño a componentes celulares por especies oxidantes, protegiendo a la célula del daño oxidativo.

El miocardio tiene una variedad de sistemas antioxidantes endógenos, enzimáticos y no enzimáticos que son suficientes para metabolizar ROS generados durante la actividad celular normal. Los mecanismos no enzimáticos comprenden antioxidantes intracelulares como el glutatión, vitamina E y C, entre otros. Las enzimas antioxidantes más importantes son la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa y las peroxiredoxinas. Además las proteínas que se unen a metales de transición son un componente crucial de los sistemas de defensa antioxidante al secuestrar el cobre y el hierro para que no estén disponibles para catalizar la formación de $OH^\bullet$ vía reacción de Fenton.

ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Vitamina E

El α -tocoferol es una sustancia lipofílica que atrapa radicales, que se encuentra naturalmente en las membranas celulares y lipoproteínas del plasma. La vitamina E reacciona rápidamente con radicales peroxilo ($ROO^\bullet$) formados por peroxidación de ácidos grasos polinsaturados, interrumpiendo la cadena autocatalítica de peroxidación de lípidos[66]. El radical tocoferoxil resultante es de reactividad baja debido a la estabilización por resonancia y es reducido por reacción con vitamina C; también puede reaccionar con otro radical tocoferoxil formando un dímero estable. La vitamina E no previene la formación inicial de radicales centrados en

carbono en el ambiente rico en lípidos pero previene la formación de radicales secundarios deteniendo la cadena de propagación[67].

Vitamina C

El ascorbato es un antioxidante importante en la fase acuosa que evita la propagación en cadena de los radicales. Puede reaccionar con superóxido, peróxido de hidrogeno, radical hidroxilo, ácido hipocloroso, y oxígeno singlete. Durante su actividad antioxidante el ascorbato puede sufrir una reducción por dos electrones, siendo inicialmente transformado a radical semidehidroascorbil y luego a dehidroascorbato. El semidehidroascorbil es relativamente estable por la dispersión de la carga entre los átomos de oxígeno[67].

Glutatión

El glutatión reducido, un tripeptido de L--glutamyl-L-cysteinylglycine, es uno de los principales antioxidantes en el compartimento intracelular, presente en concentraciones milimolares. Su grupo sulfhidrilo puede funcionar directamente como un antioxidante donando un electrón para neutralizar radicales así como actuando como factor esencial para la glutatión peroxidasa. Además el glutatión es capaz de reducir la vitamina C y E a su forma activa[33].

ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Los sistemas antioxidantes enzimáticos están ubicados en los lugares de producción más activa de oxidantes.

Los sistemas enzimáticos más importantes para eliminar las especies reactivas formadas dentro de la célula son:

Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa es la enzima encargada de remover el superóxido formado en la célula generando peróxido de hidrogeno que tiene a su vez efectos tóxicos y debe ser rápidamente eliminado por la glutatión peroxidasa o la catalasa. Todos los miembros de esta familia de enzimas utilizan metales de transición en sus sitios activos. Existen diferentes formas de esta enzima, con diferentes localizaciones subcelulares y distribución en los tejidos. En el citoplasma se encuentra la CuZnSOD y en la mitocondria la MnSOD[23].

Glutación peroxidasa

La glutación peroxidasa reduce el H_2O_2 y otros hidroperóxidos, a expensas de glutación y glutación reductasa que utiliza NADPH como cofactor. La actividad de esta enzima depende de niveles elevados de glutación por lo que bajos niveles del mismo hacen la célula más sensible al estrés oxidativo. Cuando se producen grandes cantidades de ROS, la velocidad de oxidación de GSH puede ser mayor que la de reducción de GSSG, llevando a que éste se acumule; esta situación es agravada en situaciones de escasez de NADPH. Al eliminar el peróxido esta enzima evita la formación de radicales más tóxicos como el $OH^{\bullet}$ [33].

Peroxiredoxina 3

Es una enzima antioxidante de la mitocondria, miembro de la familia de las peroxirredoxinas que pueden eliminar peroxinitrito y peróxido de hidrogeno en cooperación con tioles. Utiliza la Trx-2 mitocondrial como donante de electrones para su actividad peroxidasa. Es importante destacar que esta enzima detoxifica el peroxinitrito [61].

Los estudios realizados con esta enzima, y su localización específica en la mitocondria sugiere que el estrés oxidativo mitocondrial juega un rol importante en el desarrollo y progreso de la IC y que los antioxidantes localizados específicamente en la mitocondria proveen de una primera línea de defensa ante estos procesos patológicos.

Catalasa

La catalasa, hemoproteína tetramérica, metaboliza al peróxido de hidrogeno a oxígeno y agua a través de una reacción de 2 pasos. En la mayoría de las células la catalasa solo se encuentra en los peroxisomas, donde es la encargada de detoxificar el H_2O_2 formado por la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga [68]. Una excepción consiste en el caso de los eritrocitos en los que la catalasa está presente en concentraciones relativamente altas y es una defensa fundamental contra el daño oxidativo en estas células.

CONSECUENCIAS DEL AUMENTO EN LAS ESPECIES REACTIVAS

Los efectos fisiopatológicos de los ROS dependen del tipo, concentración y sitio específico de producción. Cuando los niveles de ROS locales son relativamente altos, estos reaccionan con proteínas, ADN, membranas y otros, causando daño celular considerable, además de generar otros ROS más reactivos. A bajas concentraciones la producción local de ROS sirve como segundo mensajero a través de la modulación específica de moléculas de señalización intracelular. Igualmente, bajas concentraciones de oxidantes muy fuertes como $\cdot\text{OH}$ pueden causar daños oxidativos severos a macromoléculas y organelos de la célula que pueden llevar a la disfunción cardíaca, mientras que especies menos oxidantes a bajas concentraciones están involucradas en la señalización redox que puede causar adaptación o mala adaptación del corazón.

DAÑO OXIDATIVO

Cuando están presentes en concentraciones relativamente altas, las especies reactivas son responsables de importantes alteraciones en las estructuras celulares. El daño oxidativo causado por los ROS involucra básicamente 3 componentes de las células: ADN, proteínas y lípidos de membrana.

Las proteínas son de los blancos principales de las ROS debido a su abundancia en sistemas biológicos y la velocidad de su reacción con las ROS. La mayoría del daño oxidativo a proteínas es irreversible y tiene consecuencias deletéreas en la estructura y función proteica. El nivel de susceptibilidad para reaccionar con los ROS depende de su nivel de insaturación y del contenido en grupos sulfhidrilos. La alteración de las proteínas por los ROS puede llevar a cambios conformacionales, oxidación de los grupos SH de las proteínas y agregación proteica[69]. Estas modificaciones pueden llevar a cambios en la actividad enzimática, en la permeabilidad de canales de membrana y a la modificación de receptores de membranas. Todos los residuos de aminoácidos son susceptibles de ser oxidados por la acción de ROS/RNS, en especial los residuos metionina y cisteína. La oxidación de la Cys puede llevar a la formación de disulfuros mixtos entre la proteína y tioles de bajo peso molecular como el GSH (glutathionilación de proteínas) [70]. La concentración de grupos carbonilo, formados por varios mecanismos es un buen indicador de oxidación proteica mediada por ROS.

Las proteínas alteradas al reaccionar con ROS son reconocidas como anormales por la célula, lo que aumenta su susceptibilidad al ataque proteolítico, y si el daño ocurre en proteínas de la

superficie externa de la membrana puede inducir una respuesta inmune. Las modificaciones redox a proteínas del miocardio como oxidación de Cys y Met, hidroxilación de Arg y Pro, nitración de Tyr, puede llevar a la alteración de la estructura y la estabilidad, y por lo tanto de la función de proteínas diversas, como transportadores de iones, receptores, caspasas, quinasas, fosfatasas, GTPasas, factores de transcripción y proteínas estructurales y contráctiles. Tanto los corazones envejecidos como con falla cardiaca muestran altos niveles de proteínas oxidadas irreversiblemente, por ejemplo nitración de residuos tirosina.

Algunos oxidantes tienen un patrón específico de daño ya que reaccionan con un número limitado de residuos de aminoácidos, mientras que otros como el $\text{OH}^\bullet$, llevan a daño más extendido y no específico.

Alta producción celular de RNS, conduce a un estado de estrés nitrooxidativo, donde pueden modificarse residuos de tirosina por nitración. El mecanismo de nitración de Tyr se da en dos pasos, el primero es la oxidación del anillo aromático de la Tyr para dar el radical tirosilo y luego la adición de $\text{NO}_2^\bullet$, radical derivado del peroxinitrito[71].

En caso de desarrollarse un estado de estrés oxidativo sistémico, una de las proteínas que se espera que sufra modificaciones oxidativas es la hemoglobina, por estar en concentraciones relativamente altas en sangre. Se han visto modificaciones oxidativas de la hemoglobina que afectan tanto el grupo hemo como la cadena polipeptídica. Tanto el $\text{O}_2^\bullet$, el H_2O_2 y el ONOO^- son capaces de reaccionar con esta proteína [72, 73]

Las modificaciones de los lípidos es otra característica central del daño oxidativo. Los radicales libres reaccionan con lípidos poliinsaturados generando peróxidos lipídicos y radicales peroxilo. Este proceso es estimulado por la presencia de iones metálicos y puede ser autocatalítico, por lo que un solo radical puede modificar muchas moléculas de lípidos de membrana. La peroxidación de lípidos de membrana altera las propiedades de viscosidad y deformabilidad de la misma, así como la actividad de canales de transporte y enzimas que se encuentran en ella[74].

El daño al ADN resulta de modificaciones oxidativas a las bases nitrogenadas y roturas de las hebras de ADN, esto induce la activación de mecanismos de reparación del ADN. Está comprobado que el $\text{OH}^\bullet$ reacciona con todos los componentes del ADN, causando modificaciones tanto a las bases nitrogenadas como al esqueleto ribosa-fosfato. Las modificaciones oxidativas al ADN pueden ser el evento inicial en la mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento[75, 76].

ALTERACIONES EN LA SEÑALIZACION REDOX

La señalización redox se refiere al proceso regulatorio en el que la señal se transmite a través de reacciones redox. En este proceso el estado estacionario del balance redox es perturbado por un aumento en la formación de ROS o una disminución de la actividad de sistemas antioxidantes. En este tipo de vías de señalización, generalmente la transmisión y amplificación de señales involucran modificaciones oxidativas a proteínas. En condiciones patológicas las concentraciones anormalmente altas de ROS y RNS pueden llevar a cambios permanentes en la transducción de señales y expresión génica, lo que puede llevar al desarrollo de enfermedades.

Los blancos más susceptibles de las ROS involucrados en la señalización, podrían ser los tioles de la cisteína, cuya oxidación puede llevar a la formación de puentes disulfuro inter o intramoleculares o a otras modificaciones como nitrosilación o glutatiónilación. Existen varias proteínas cuya actividad está modulado por el cambio en el estado redox de sus tioles. En el corazón se han identificado proteínas moduladas de esta forma, incluyendo algunas muy importantes para la función de los cardiomiocitos. El balance entre los estados oxidados y reducidos de estas proteínas depende de la producción de ROS local, la actividad de tiol-peroxidasas y el nivel de reductores como el glutatión [77, 78].

La IC está asociada con alteraciones de varias vías de señalización que involucran ROS en el miocardio, incluyendo el sistema renina-angiotensina y el SNS, factores de crecimiento, citoquinas y óxido nítrico. Probablemente existen múltiples niveles de interacciones autocrinas y paracrinas entre estos mediadores que resultan en efectos negativos y positivos.

La inactivación del *NO por el superóxido lleva a alteraciones en la señalización celular, tanto por la disminución de la biodisponibilidad del *NO como por los efectos del peroxinitrito[79].

ROS y remodelamiento del miocardio

Durante la progresión del síndrome de IC, la interferencia de las altas concentraciones de ROS en vías de señalización celular, inducen la hipertrofia de los miocitos, la alteración de la matriz extracelular y la muerte celular, procesos que llevan al remodelamiento del miocardio, lo que contribuye en gran medida al desarrollo de la disfunción cardíaca[80].

Numerosos estudios experimentales han demostrado que las ROS endógenas están involucradas en la modulación de vías que llevan a la hipertrofia cardíaca. Las ROS juegan un papel esencial en mediar la hipertrofia cardíaca en respuesta a agonistas alfa adrenérgicos

como angiotensina II, endotelina I, y TNF α en cardiomiocitos, los cuales se encuentran en concentraciones mayores a las normales en la IC. Una de las fuentes de estas especies parece ser la NADPH oxidasa, en particular la isoforma Nox2, esto está evidenciado ya que ratones KO para Nox2, exhiben una inhibición de la hipertrofia inducida por administración crónica de Ang II. La señalización por ROS también está implicada en hipertrofia causada por sobrecarga de presión, donde se ha observado un aumento en la expresión y actividad de Nox[50].

Las ROS también afectan al tejido conectivo, al estimular los fibroblastos cardiacos, regulando la síntesis de colágeno y activando las metaloproteasas (MMP) de matriz. Las ROS realizan esta activación de las MMP por varios mecanismos, no solo activan directamente estas enzimas postranscripcionalmente sino además inducen la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de los genes de las MMP. Experimentalmente, la IC está caracterizada por una activación de las MMP de la matriz lo que lleva a la ruptura de la estructura de matriz de colágeno que normalmente une a los cardiomiocitos[81, 82].

El remodelamiento cardiaco conlleva una tasa aumentada de muerte celular. Las ROS/RNS son un factor clave para la estimulación de la apoptosis en los cardiomiocitos, células endoteliales y fibroblastos[83]. La apoptosis es extremadamente rara en el miocardio sano, pero en modelos experimentales de IC y cardiomiopatías, se ve aumentada y juega un rol patológico significativo. En IC humanas clasificadas como clase III-IV, las células apoptóticas se observan en un rango de 0.21-0.70%. Este número puede parecer bajo, pero si uno considera que la apoptosis tarda como máximo 24h para completarse, y que la IC se desarrolla durante varios años, se puede considerar que la pérdida crónica de cardiomiocitos a través del tiempo puede tener un efecto grave en la estructura y función del miocardio. Estudios con ratones que expresan una caspasa activa específicamente en el miocardio muestran una relación directa y causal entre los niveles de apoptosis y la progresión hacia IC avanzada[84].

Recientemente se han identificado múltiples estímulos para la muerte celular de los cardiomiocitos, como fuerza excesiva, agonistas de los receptores adrenérgicos como la angiotensina, ROS/RNS, citoquinas proinflamatorias y alteraciones en el citoesqueleto[85].

La importancia del estrés oxidativo en la apoptosis de los cardiomiocitos es demostrada por el hecho de que varias enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y Prx3 reducen la apoptosis y atenúan la progresión de la falla cardiaca[61]. El estrés oxidativo estimula la vía intrínseca de la apoptosis por varios mecanismos como la apertura del MPTP, la translocación

de proteínas Bax a la mitocondria, activación del factor de transcripción p53 por daño al ADN y activación de caspasas[86].

ROS y disfunción contráctil

La disfunción contráctil es una característica central de la IC, que tiene una base multifactorial e involucra cambios en la función contráctil de los cardiomiocitos así como la alteración de la estructura y propiedades de la cámara. Estudios in vitro han demostrado que un aumento en los ROS pueden disminuir la contractibilidad de los cardiomiocitos por varios mecanismos como alteraciones en el ciclo del calcio, en la respuesta al calcio de los miofilamentos, así como efectos negativos en el metabolismo energético de las células. En IC inducida por sobreestimulación se observó una correlación entre el grado de disfunción contráctil y la producción mitocondrial de ROS. En otros estudios, la producción de radical superóxido por la XO se correlacionó con el desarrollo de la disfunción contráctil en el VI, ya que el inhibidor de esta enzima, alopurinol, mejoraba la función del VI y disminuía el consumo de oxígeno. El efecto perjudicial del radical superóxido producido por la XO puede involucrar la inactivación de NO ya que este disminuye el consumo de oxígeno y aumenta la eficiencia cardiaca[50, 80, 87]. Las ROS producidas por las NADPH oxidasas también parecen estar involucradas en la disfunción del miocardio que se da en la IC [88].

Se ha observado un efecto inhibitorio directo de la función de los miofilamentos causada por los ROS, aunque no se sabe el mecanismo preciso, las fuentes potenciales de estos ROS incluyen la XO[54]. Además, puede haber un efecto indirecto de los ROS sobre los miofilamentos, al afectar varias protein quinasas que inducen la fosforilación de proteínas de los miofilamentos como la troponina I y la proteína C de unión a miosina[39].

En condiciones como la insuficiencia cardiaca, el acoplamiento excitación-contracción, el cual es esencial para la función de los cardiomiocitos, se encuentra desregulado. En este proceso, la despolarización de la membrana lleva a la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, y la subsecuente liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico (SR), por la apertura de canales de calcio dependientes de calcio (RyR). La unión del calcio a la troponina, inicia la contracción. En la relajación, el calcio es activamente devuelto al SR vía la SR calcio ATPasa (SERCA). La apropiada regulación del ciclo del calcio es esencial para el acoplamiento excitación-contracción, y es una posible falla en los procesos patológicos, contribuyendo no solo a la disfunción contráctil, sino también a la disfunción energética y producción de ROS en la mitocondria. La señalización redox puede afectar a varios componentes del proceso de acoplamiento[89, 90].

RyR tiene 90 residuos de Cys, 20 de los cuales se encuentran reducidos por lo que serían un blanco potencial para modificaciones redox como nitrosilación y formación de enlaces disulfuro. Experimentos con membranas lipídicas mostraron que especies como $\cdot\text{NO}$, peróxido de hidrogeno e hidroxilo radical pueden inducir modificaciones redox en la proteína RyR. Las consecuencias de esta modificación varían según la naturaleza de la especie, la concentración y el tiempo de exposición, el tipo de modificación y el residuo específico de Cys que es modificado. En general las modificaciones oxidativas aumentan la probabilidad de apertura del canal, y por lo tanto la liberación de calcio.

Recientemente algunos estudios han mostrado que la pérdida de calcio en la diástole y la contracción debilitada en ratas con insuficiencia cardíaca causada por hipertensión, podría deberse a la oxidación de RyR por superóxido proveniente de la XO, y también por la disminución en la nitrosilación de esta proteína causada por la baja biodisponibilidad de $\cdot\text{NO}$.

Hace ya algunos años que se ha demostrado que la SERCa puede sufrir modificaciones oxidativas como nitración de tirosinas y oxidación de cisteínas. Se piensa que bajos niveles de ROS pueden activar a SERCA, mientras que altos niveles la inactivan debido a modificaciones oxidativas irreversibles. La concentración disminuida de Calcio al estimular cardiomiocitos sometidos a estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrogeno, podría deberse a una menor actividad de SERCA. Aunque hallazgos hechos en otros tejidos apoyan el hecho de que existe una regulación redox de esta proteína y que ésta es biológicamente relevante, la evidencia de esto para la isoforma de esta proteína que se encuentra en los cardiomiocitos todavía es limitada[39].

ROS y fibrosis intersticial cardíaca

Se ha visto que el estrés oxidativo es profibrótico en muchos órganos y parece ser así también en el corazón. Las ROS derivados de la Nox2 parecen estar involucradas en el desarrollo de la fibrosis, ya que la fibrosis intersticial está inhibida en ratones deficientes en Nox2. Varios mecanismos parecen estar involucrados en los efectos pro-fibroticos de la Nox2, incluyendo aumento en la expresión de genes y factores de crecimiento profibróticos, aumento en la activación de NFkB, activación de MMP e infiltración de células inflamatorias[89].

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Este estudio está basado en la hipótesis oxidativa de la Insuficiencia Cardíaca. Tomando en cuenta el hecho de que parece existir un estado de estrés oxidativo sistémico en pacientes que sufren esta enfermedad, se decidió medir distintos marcadores del mismo en pacientes con diferentes grados de avance de la enfermedad. Para evaluar la eficiencia de estos marcadores en predecir la gravedad de la IC, se compararon con factores que se utilizan en la actualidad para diagnosticar y evaluar la severidad de la IC, la Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo (FEVI) y la clase funcional según la New York Heart Association. Los indicadores de estrés oxidativo sistémico elegidos fueron la concentración de tioles en plasma, la capacidad antioxidante total del plasma, la concentración de nitrito y nitrato en plasma, y la relación entre dímeros y monómeros de hemoglobina en la fracción celular de la sangre.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad de factores pronósticos no convencionales para estimar la gravedad de IC en pacientes ambulatorios portadores de la enfermedad, por comparación con factores de diagnóstico convencionales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinación de parámetros indicativos de estrés oxidativo sistémico: capacidad antioxidante del plasma, concentración plasmática de tioles y análisis de dímeros de hemoglobina en la población antes mencionada.
- b. Determinación de parámetros indicativos de estrés nitrosativo sistémico: concentración de nitrito/nitrato en plasma.
- c. Comparación de los parámetros bioquímicos antes mencionados, con factores diagnóstico convencionales clínicos (CF) y paraclínicos (FEVI) de IC.

MATERIALES Y MÉTODOS

GRUPO EN ESTUDIO

Se estudia un grupo de 95 pacientes portadores de IC que se asisten ambulatoriamente en la Unidad Multidisciplinaria de Insuficiencia Cardíaca (UMIC) perteneciente al Departamento Clínico de Medicina del Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela”.

Los pacientes incluidos en el estudio son diagnosticados y clasificada su severidad según los factores diagnóstico de IC descritos en la Introducción, la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y la clase funcional.

Los criterios para la inclusión de los pacientes en el estudio es que sufrieran una disfunción sistólica con una FEVI < 40%, de cualquier etiología (isquémica o no isquémica), de ambos sexos, mayores a 18 años. El criterio de exclusión consistió en la negativa expresa por parte del paciente en la participación del proyecto.

Al ingreso a los pacientes se les realiza anamnesis y examen físico que llevó a la determinación de la Clase Funcional de la IC según la clasificación de la New York Heart Association (NYHA), y se determinó la FEVI mediante ecocardiografía transtorácica. También se procede a la extracción de muestra de sangre venosa sistémica para realizar las determinaciones bioquímicas.

Los pacientes seleccionados para su inclusión en el estudio fueron debidamente informados acerca de los pormenores del mismo. Los pacientes incluidos avalaron su participación mediante la firma de un consentimiento informado. Este estudio fue aprobado por la Comisión de Ética del Hospital de Clínicas y de la Facultad de Medicina por la participación de seres humanos.

EXTRACCIÓN DE SANGRE Y TRATAMIENTO DE LA MISMA

La misma se realiza mediante venopunción con extracción de 20 mL de sangre venosa. Posteriormente se centrifuga a 3000rpm a 4°C por 10 min con el objetivo de separar la porción celular de la porción plasmática. Tanto el plasma como las células se conservan a -20°C.

Determinación de la concentración de tioles

Los tioles presentes en la fracción plasmática se determinan por reacción con 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB, reactivo de Ellman). La muestra (50 µL) se incuba con 1 ml de DTNB 0.2 mM, luego la concentración de TNB producida se mide espectrofotométricamente a 412 nm ($\epsilon_{\text{TNB}} = 14.15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La concentración de tioles se expresa en relación con la concentración de albúmina HSA, principal contribución de grupos SH en el plasma[91].

Capacidad Antioxidante del Plasma

La capacidad antioxidante del plasma se mide mediante la técnica FRAP (capacidad reductora total o Ferric Reducing Antioxidant Power), que evalúa la capacidad de las muestras de reducir hierro (M in EnzVol 299, 64 de Anabel). Para realizar este ensayo se incuban 10 µL de muestra en presencia de 240 µL de reactivo de FRAP, que consiste en FeCl_3 60 µM y tripiridiltriazina (TPTZ) 30 µM en buffer acetato, pH 3.6. A los 4 min se lee la absorbancia a 593 nm. El poder antioxidante total del plasma se calcula relacionando el cambio de absorbancia de la muestra con la curva de calibración realizada con una solución estándar de ácido úrico[92].

Determinación de Nitrito (NO_2^-) y Nitrato (NO_3^-)

La concentración de nitrito y nitrato en el plasma de los diferentes pacientes se realiza mediante el método de Griess, el cual se basa en la reacción del NO_2^- con la sulfamida (S) a pH ácido y la reacción del producto con naftiletilendiamina (N), lo que lleva a la producción de un cromóforo que absorbe a 540 nm. Para determinar la concentración de nitrato se procedió a la reducción de éste a nitrito, con vanadio 25 mM final [93]. Por lo que se mide siempre concentración de nitrito por Griess. La concentración de nitrato se calcula mediante la diferencia de las concentraciones de nitrito, previamente y luego al agregado del vanadio. Antes de realizar las determinaciones se filtra el plasma en centricones (7500g por 15 minutos) para remover las partículas de alto peso molecular que podrían interferir con el ensayo

Para determinar la concentración de nitrito se incuban 150 µL de muestra previamente filtrada con 150 µL de reactivo de Griess (75 µL S + 75 µL N). En el caso del nitrato se incuban 100 µL de muestra con 100 µL de reactivo de Griess (50 µL S + 50 µL N) y 100 µL de cloruro de vanadio. La curva de calibración se realiza con soluciones estándar de nitrato de sodio y nitrito de sodio.

Las medidas en placa de las técnicas de Griess y FRAP se realizan en el lector de microplacas absorbancia/fluorescencia UV/vis Varioskan Flash

FACTORES PRONÓSTICO NO CONVENCIONALES EN FRACCIÓN CELULAR

Electroforesis de Hemoglobina

Se determina la concentración de oxiHemoglobina (oxiHb) y metahemoglobina (metHb) espectrofotométricamente mediante la medida de la absorbancia a 577 y 630 nm como fue descrito previamente[94].

$$\text{oxiHb } (\mu\text{M}) = 66 A_{577} - 80 A_{630}$$

$$\text{metHb } (\mu\text{M}) = 279 A_{630} - 3 A_{577}.$$

Se analiza la existencia de productos oxidados de la hemoglobina de alto peso molecular, para esto se preparan muestras de la porción de glóbulos rojos para la realización de electroforesis monodimensional en gel de poliacrilamida (12%), en condiciones desnaturalizantes (4% SDS) pero no reductoras, utilizando un dispositivo HoeferMighty Small SE245 y Hoefer Small II para geles de 7-8 cm (AmershamPharmaciaBiotech). Cada gel se corre a una intensidad constante de 25 mA. Se desnaturalizan las proteínas en la muestra por tratamiento a 90°C por 3 minutos en buffer de muestra (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 0.053% azul de bromofenol). En cada condición se siembran 10 µg de proteína por carril. Para el revelado de las proteínas en el gel se utiliza el método de tinción con nitrato de plata.

Las medidas de cuantificación de hemoglobina, se realizan en un espectrofotómetro VarianCary 50 UV-visible.

Análisis Estadístico

Las determinaciones se realizan por triplicado. Las diferencias entre los diferentes grupos se evalúan mediante test de student, tomando como diferencia significativa una $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base en la hipótesis oxidativa de la insuficiencia Cardíaca, se analizó la relación existente entre parámetros clásicos de evaluación de la severidad de la IC con el desarrollo de un estado de estrés oxidativo crónico, analizando marcadores en el plasma y en la porción globular de la sangre, relacionados con el aumento en la concentración de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.

Para esto se estudió la relación de los factores utilizados en la clínica para evaluar el progreso de la enfermedad, es decir la FEVI y la clase funcional, respecto a los indicadores de estrés nitro-oxidativo seleccionados, que en el plasma consistieron en la concentración total de tioles, el valor de capacidad antioxidante del plasma y la concentración de nitrito y nitrato, y en la porción globular la relación entre dímeros y monómeros de Hemoglobina.

FACTORES NO CONVENCIONALES DE PRONÓSTICO DE IC EN LA PORCIÓN PLASMÁTICA DE LA SANGRE

En la Figura 5 se observa la relación de los factores de diagnóstico convencionales de pacientes con diferente grado de avance de IC, con la concentración de tioles en plasma, la cual se expresa como mmoles de tioles por mmol de HSA, ya que fue realizada una estandarización respecto a la concentración plasmática de HSA de cada paciente, teniendo en cuenta que esta proteína es la principal contribuyente de tioles en el plasma. Esta estandarización es necesaria debido a que el edema es un síntoma de la enfermedad, que puede generar una disminución en la concentración normal de esta proteína, además de las leves variaciones que pueden existir entre diferentes individuos.

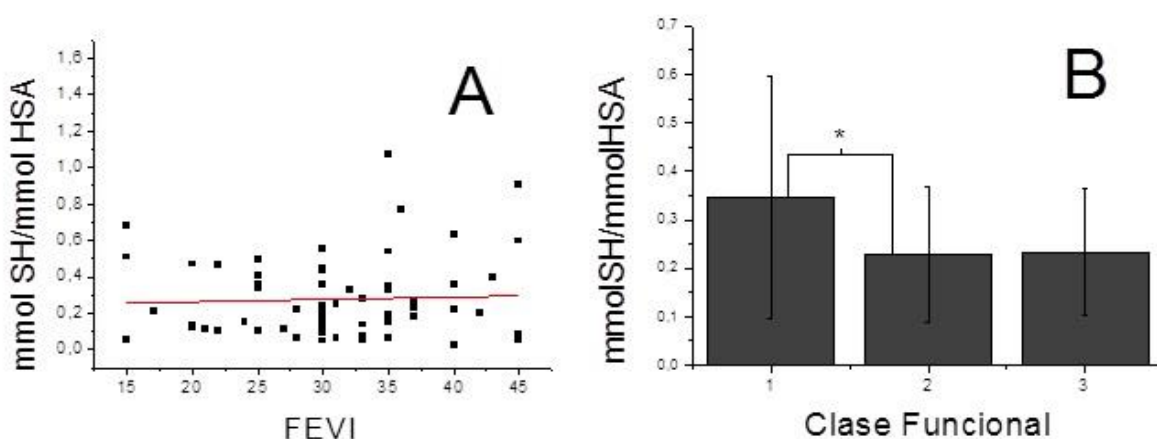


Figura 5. Relación entre parámetros clínicos usados para evaluar la IC y la concentración de tioles en plasma, expresada como mmolSH/mmolHSA. **A** Relación entre FEVI y concentración de tioles. **B** Promedio de concentración de tioles en cada Clase Funcional. Datos expresados como promedio $\pm$ SD. (*) $p < 0.05$. Valores normales estimados en aproximadamente 0,7mmolSH/mmolHSA[91].

Como se observa en la Figura 5A, no parece existir una relación entre la concentración de tioles en plasma y la FEVI, ya que no se observa una tendencia significativa mediante el ajuste lineal utilizado. Según la hipótesis oxidativa, se esperaba que la concentración de tioles disminuyera a medida que la enfermedad progresa, es decir cuando disminuyera la FEVI y aumentara la CF de los pacientes en estudio, ya que a medida que el estado del paciente se agrava, la concentración de especies reactivas sufre un aumento, y por lo tanto ocurre una mayor oxidación de tioles, disminuyendo su concentración en el plasma.

En el caso de la CF vemos una disminución significativa de la concentración de tioles en plasma cuando la IC progresa desde la clase I a la clase II (Figura 5B). Esta diferencia no se observa entre la clase II y la clase III, como se esperaba, ya que esta última representa un estado más avanzado de la enfermedad. La oxidación de los tioles en el plasma se puede dar por varias especies reactivas como el H_2O_2 y el $ONOO^-$, llevando a diferentes productos.

Para evaluar la capacidad antioxidante total del plasma se utilizó la técnica FRAP, en la Figura 6 se muestra el valor de FRAP del plasma de muestras de pacientes en relación con los factores diagnóstico de IC.

Esta técnica evalúa las defensas antioxidantes no enzimáticas del plasma de los pacientes. Si la producción de ROS y RNS supera la renovación de las defensas antioxidantes, como se espera que suceda en un estado de estrés oxidativo crónico como el de la IC, la concentración de las mismas se encontrará disminuida respecto a la concentración normal.

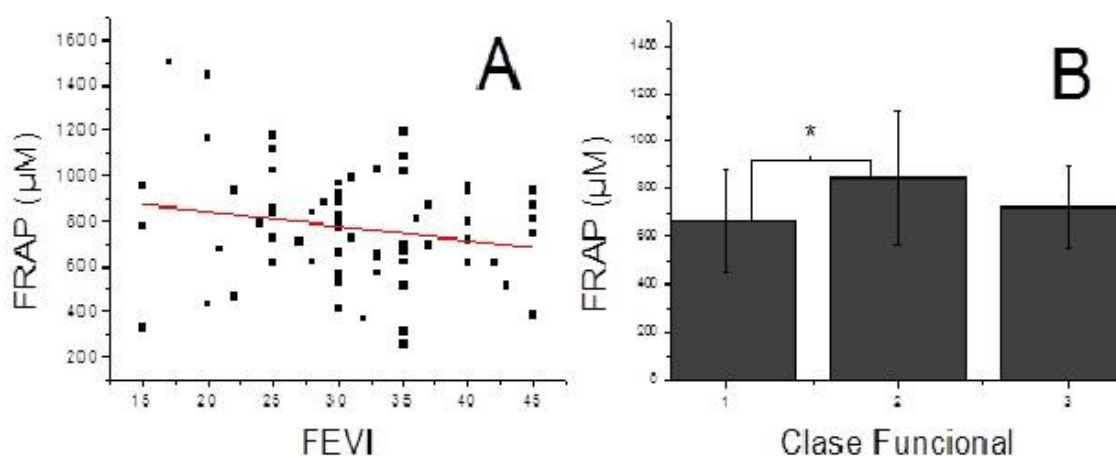


Figura 6. Relación entre parámetros clínicos usados para evaluar la IC y el valor FRAP del plasma. **A** Relación entre FEVI y valor FRAP. **B** Promedio de valor FRAP del plasma en cada Clase Funcional. Datos expresados como promedio $\pm$ SD. (*) $p < 0.05$

Se esperaba que la capacidad antioxidante del plasma disminuyera con el avance de la enfermedad, ya que al producirse una mayor cantidad de especies reactivas, los antioxidantes se consumirían en mayor grado tanto a nivel celular como en el plasma. Como se observa en la Figura 6, éste no fue el resultado que se obtuvo, ya que las gráficas muestran una tendencia de aumento de la capacidad antioxidante cuando disminuye la FEVI y aumenta la CF, es decir al avanzar la enfermedad se observa un aumento de la capacidad antioxidante. Esto se contradice con la hipótesis oxidativa de la IC, pero puede ser explicado por el hecho de que los pacientes involucrados en este estudio están bajo tratamiento, y algunos de los medicamentos utilizados pueden generar una respuesta antioxidante. Al avanzar la enfermedad se trata en mayor medida a los pacientes, explicando que aumente el valor FRAP cuando se observa una progresión de la enfermedad a través de los indicadores diagnósticos convencionales. Otra posible causa de esta aparente “contradicción” entre lo encontrado y la hipótesis oxidativa de la IC es que, al existir un aumento significativo de las especies oxidantes se active un mecanismo compensador que aumente la concentración de especies antioxidantes en plasma, regulando su absorción, excreción y/o síntesis.

Para analizar el grado de producción de especies reactivas del nitrógeno en las diferentes etapas de la enfermedad se evaluó la concentración de nitrito y nitrato en plasma. El nitrito y el nitrato son productos finales del metabolismo del óxido nítrico y peroxinitrito endógeno. El $\cdot\text{NO}$ producido por las enzimas NOS es oxidado en la sangre y los tejidos para formar nitrito y nitrato. La reacción del $\cdot\text{NO}$ con la hemoglobina produce nitrato, mientras que la oxidación de $\cdot\text{NO}$ produce nitrito. La descomposición del peroxinitrito puede llevar a la formación tanto de nitrito como de nitrato.

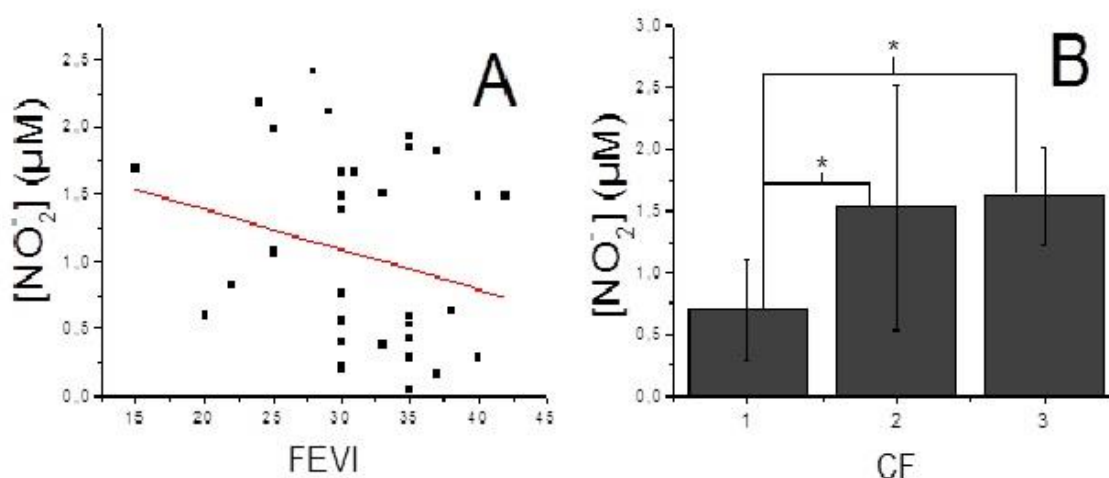


Figura 7. Relación entre parámetros clínicos usados para evaluar la IC y la concentración de nitrito en plasma medido por la técnica de Griess **A** Relación entre FEVI y concentración de nitrito en plasma. **B** Promedio de concentración de nitrito en plasma en cada Clase Funcional. Datos expresados como promedio $\pm$ SD. (*) $p < 0.05$. Valor reportado de concentración de nitrito en plasma de adultos sanos es de $0,466 \mu\text{M}$ [92].

Como se observa en la Figura 7 se encontró que la concentración de nitrito aumenta a medida que aumenta la gravedad de la enfermedad. Existe una diferencia significativa en la concentración de nitrito en el plasma entre pacientes con IC de clase funcional I y pacientes que sufren IC con clase funcional II y III. Además parece existir una tendencia de aumento en la concentración de nitrito a medida que disminuye la FEVI de los pacientes.

En el caso de la concentración de nitrato en plasma, se obtuvo una tendencia inversa que con el nitrito, es decir su concentración parece disminuir al progresar la enfermedad, como se puede observar en la Figura 8.

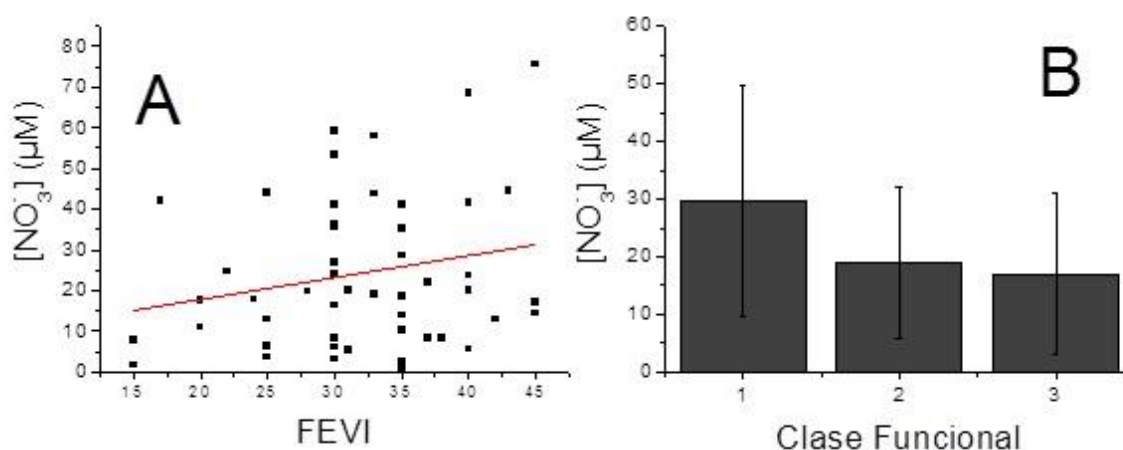


Figura 8. Relación entre parámetros clínicos usados para evaluar la IC y la concentración de nitrato en el plasma medido por la técnica de Griess. **A** Relación entre FEVI y concentración de nitrato en plasma. **B** Promedio de concentración de nitrato en plasma en cada Clase Funcional. Datos expresados como promedio $\pm$ SD. (*) $p < 0.05$. Valor reportado de concentración de nitrato en plasma de adultos sanos es de $41,3\mu\text{M}$ [92].

Se esperaba que la relación de los dos aniones con los indicadores diagnóstico de la IC fuera similar ya que su metabolismo está relacionado y ambos darían cuenta de una mayor producción de óxido nítrico celular. La diferencia en las variaciones de concentración de nitrito y nitrato en plasma e puede explicar por las variaciones en la dieta de los pacientes ya que el contenido de nitrato en la dieta es considerable y muchos vegetales son particularmente ricos en este anión, que puede ser reducido a nitrito por bacterias de la flora normal salival, en cambio el nitrito es más difícil de encontrar en una dieta normal.

El aumento de la concentración de nitrito en el plasma podría indicar un aumento en la producción de *NO , lo que ocurre en situación proinflamatoria. Es posible que en la IC se desarrolle un contexto inflamatorio, con aumento en la producción de especies reactivas y que

esto contribuya a la progresión de la enfermedad. Esto parece estar respaldado por el aumento de citoquinas como el $\text{TNF}\alpha$ que ocurre en la IC, y por estudios realizados que muestran una correlación entre este aumento y el desarrollo y progreso de la enfermedad.

Si consideramos, como lo propone la hipótesis oxidativa, que la insuficiencia cardíaca se da en un contexto de aumento en la producción de ROS, en particular de superóxido, el $\cdot\text{NO}$ producido reaccionará con este radical, ya que su reacción se da con velocidad controlada por difusión, y el $\cdot\text{NO}$ difunde fácilmente a través de membranas. Esto nos permite pensar que existirá una producción de peroxinitrito, que podría estar implicado en la fisiopatología de la enfermedad, causando un daño irreversible a la mitocondria, lugar de mayor producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (el cual no difunde por su carácter aniónico). Cuando actúa como oxidante el peroxinitrito suele producir mayormente nitrito, en lugar de nitrato, lo que podría explicar las diferencias que se observaron en la relación de estos dos aniones con los factores convencionales de diagnóstico de la IC.

El $\cdot\text{NO}$ está asociado a las especies reactivas del oxígeno no solo, por su reacción con el $\text{O}_2^{\cdot-}$, sino que también puede influir en su producción, por ejemplo el $\cdot\text{NO}$ inhibe la citocromo C oxidasa lo que puede causar una mayor producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en la cadena respiratoria, exacerbando el estado de estrés oxidativo, por lo tanto la una mayor producción de $\cdot\text{NO}$ indicada por la mayor concentración de nitrito podría estar relacionada con el aumento en las ROS, manifestada por la oxidación de los tioles y de la Hb. Además el $\text{O}_2^{\cdot-}$ reacciona con el cofactor esencial de las NOS, tetrahidrobiopterina, causando el desacople de esta enzima, y la resultante producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Por lo tanto en estas enfermedades en las que parece desarrollarse un estado de estrés nitro-oxidativo, se establece un ciclo que podría llevar, entre otros factores, al progreso de la enfermedad.

FACTORES NO CONVENCIONALES DE PRONÓSTICO DE IC EN LA PORCIÓN GLOBULAR DE LA SANGRE

En la porción globular de la sangre se utilizó la oxidación de la hemoglobina como marcador del desarrollo de un estado de estrés oxidativo generalizado. Como producto de oxidación de la hemoglobina se determinó la presencia de dímeros covalentes de Hb que se podrían haber formado por oxidación de esta hemoproteína con peroxinitrito generado en el espacio vascular. Luego de separar monómeros de dímeros covalentes de Hb en un gel de poliacrilamida desnaturizante pero no reductor, se calculó la relación entre ellos mediante el programa ImageJ. La Figura 10 muestra el resultado obtenido un ejemplo de los geles realizados

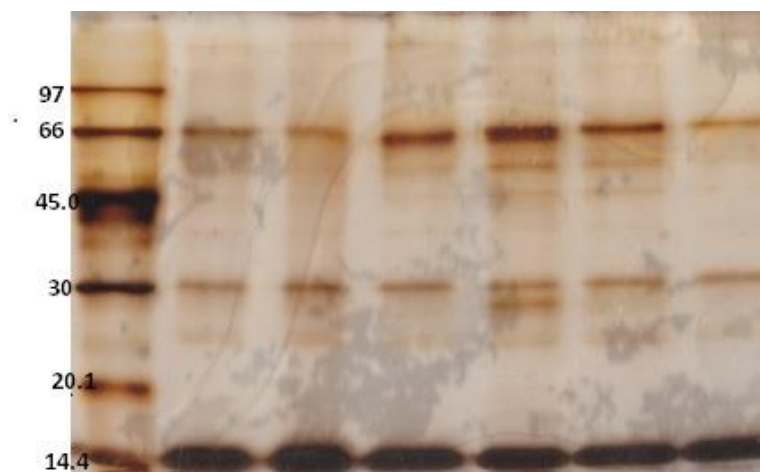


Figura 10. Ejemplo de geles realizados para evaluar la oxidación de la Hb. En todos los pocillos se sembraron muestras de Hb de diferentes pacientes.

La oxidación de la Hb parece estar relacionada con la gravedad de la enfermedad, ya que como se observa en la Figura 11, la misma aumenta tanto al disminuir la FEVI como al incrementarse la CF, lo que se infiere al obtener mayores relaciones dímero/monómero cuando los factores diagnósticos nombrados indican una mayor progresión de la enfermedad.

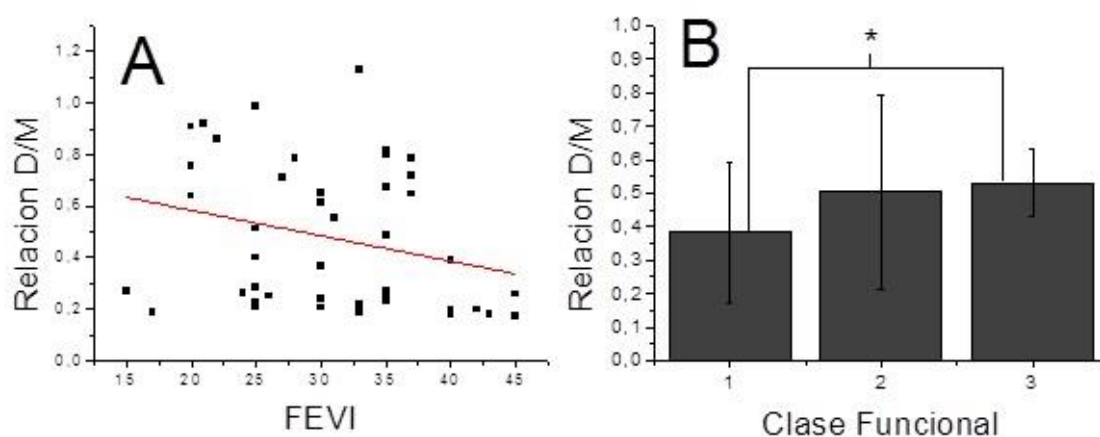


Figura 11. Relación entre parámetros clínicos usados para evaluar la IC y la relación entre monómeros y dímeros de Hb presentes en la fracción globular de la sangre. **A** Relación entre FEVI y la relación entre monómeros y dímeros de Hb. **B** Promedio de la relación entre monómeros y dímeros de Hb en cada Clase Funcional. Datos expresados como promedio $\pm$ SD. (*) $p < 0.05$

En la actualidad se cree que los glóbulos rojos actúan como sumidero de especies reactivas provenientes de los tejidos, detoxificando las mismas, tanto por la concentración intraeritrocitaria elevada de enzimas antioxidantes (peroxirredoxina, SOD, catalasa, glutatión peroxidasa) como por la hemoglobina en concentración 20 mM. La oxidación de Hb por mecanismos radicalares da lugar a radicales proteicos que recombinan para formar agregados. El aumento de la proporción de Hb en su forma dimérica en etapas más avanzadas de la

enfermedad podría estar indicando que en la IC los glóbulos rojos están actuando como atrapadores de las especies reactivas producidas en el organismo, lo que coincide con la idea de la hipótesis oxidativa de la IC, es decir un estado de estrés oxidativo crónico.

Se ha observado formación de dímeros de Hb por reacción con peroxinitrito, formando dímeros reducibles por mercaptoetanol y no reducibles por mercaptoetanol, es decir, unidos por puentes disulfuro o ditirosinas, respectivamente, por lo que el aumento de dímeros covalentes de Hb encontrados podría indicar, una producción aumentada de ONOO^- .

La oxidación de hemoglobina por peroxinitrito puede llevar a la producción de nitrito o nitrato, por lo que si esto pasara en forma significativa en el contexto de la insuficiencia cardiaca se podría esperar un aumento de estos aniones en sangre al progresar la enfermedad, en esta tesina se observó un aumento de la concentración de NO_2^- lo que concuerda con esta idea.

Si se asume que en esta enfermedad existe una producción significativa de ONOO^- , esto podría explicar en parte la disminución en la concentración de tioles en el plasma al aumentar la clase funcional de la enfermedad ya que éstos son un blanco directo de este oxidante, también pueden ser oxidados por los radicales derivados del peroxinitrito, generando radicales tiilo, $\text{RS}^\bullet$. Esto puede causar inactivación de enzimas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la creatin quinasa y los complejos de la cadena respiratoria, involucradas en metabolismo energético que se encuentra alterado en los cardiomiocitos de pacientes que presentan una falla cardiaca crónica. Pero también la modificación por ONOO^- puede llevar a la activación de enzimas, como las MMP que se sabe participan en mecanismo de citotoxicidad en las enfermedades del corazón.

Una modificación oxidativa particular de RNS como el peroxinitrito es la nitración de residuos de tirosina. Sería interesante evaluar el grado de nitración de proteínas plasmáticas así como de la Hb eritrocitaria de la sangre que podría existir en pacientes de IC como un marcador más del progreso de la enfermedad, y si existe alguna variación de este marcador de formación de peroxinitrito al agravarse la enfermedad.

El hecho de que los dímeros de Hb aumenten al agravarse el estado del paciente podría ser causado por una mayor formación de peroxinitrito, que puede indicar que aunque existe una mayor producción de $^*\text{NO}$ parece darse en un ambiente oxidativo, es decir con concentraciones de ROS más altas que lo normal, inhibiendo la actividad biológica ventajosa de $^*\text{NO}$. Este ambiente oxidativo disminuye la biodisponibilidad de $^*\text{NO}$ en el endotelio y miocardio siendo una de las posibles causas del progreso de la IC.

El NO mediante sus interacciones con componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial podría funcionar como un regulador funcional de la respiración celular y un modulador de la generación de ROS por la mitocondria, y por lo tanto afectar mecanismos de supervivencia o muerte celular. En niveles altos o presencia de ROS, el NO puede tener efectos citotóxicos mediante la formación de peroxinitrito.

Es importante destacar que en este trabajo no se logró obtener muestras de sangre de pacientes con clase funcional IV, a causa de sus síntomas que no les permite ser pacientes ambulatorios, esto es importante para confirmar la tendencia de los factores no convencionales evaluados, tomando en cuenta que en estas clases funcionales el progreso de la enfermedad es muy notorio. Además entre los pacientes involucrados en el estudio existía una menor proporción de pacientes con IC de clase funcional III que I y II, esto puede haber influenciado el hecho de que no se encontró diferencia significativa entre la clase funcional II y la III. También puede ocurrir que los cambios significativos en los factores no convencionales se den en las primeras etapas de la enfermedad, y que luego las defensas antioxidantes del organismo logren mantenerlos en este estado, aunque no se espera que suceda esto en enfermedades en que el estrés oxidativo cumple un rol patológico, debido a que en el desarrollo del mismo se dan efectos sumatorios, alguno de los cuales se han nombrado en este trabajo.

Por otra parte, se debería haber tenido en cuenta el tratamiento al que están sometidos los pacientes, para valorar si los fármacos influyen en los parámetros que se determinaron en este trabajo y clasificar a los pacientes, además de por la severidad de la enfermedad, por los fármacos que se les administran. Otro aspecto no considerado es la dieta de los pacientes que puede variar los niveles basales de nitrito/nitrato plasmáticos.

CONCLUSIONES

Varios de los posibles biomarcadores del estrés oxidativo que se estudiaron en el transcurso de este trabajo, mostraron cierto grado de relación con la progresión de la IC, lo que es consistente con la hipótesis oxidativa de la IC:

- Se observó un incremento en la relación dímero/monómero de Hb para pacientes con pronóstico pobre, indicando un aumento en la oxidación de esta proteína, mayoritaria en los eritrocitos, lo que puede ser causado por un aumento en la concentración de especies oxidantes en los pacientes.
- La concentración de nitrito se ve aumentada en pacientes en una etapa más severa de la IC, lo que sugiere un aumento en la producción de NO y posiblemente, si se da en un ambiente oxidativo, de peroxinitrito.
- Aunque no parece existir una correlación entre la concentración de tioles en plasma y la FEVI de los pacientes en el estudio, los pacientes con mayor CF de esta patología presentaron menores niveles plasmáticos de tioles.

La disminución del nivel de tioles reducidos en el plasma, y la mayor oxidación de la Hb encontradas durante este estudio pueden ser causadas por un aumento de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, lo que parece sustentar la hipótesis de que el desarrollo de la IC involucra una producción aumentada de estas especies, que estarían causando el progreso de la enfermedad por varios mecanismos como la alteración de la señalización redox, el remodelamiento del miocardio y el daño oxidativo a macromoléculas.

Teniendo en cuenta que se encontró un aumento en la concentración plasmática de NO_2^- al aumentar la gravedad de la IC, se puede pensar que en esta enfermedad existe un aumento en la producción de NO^* , lo que se da en un contexto inflamatorio, esto se ha observado en otras enfermedades crónicas, así como la presencia de la concentración de citoquinas inflamatorias en estos pacientes. Este contexto inflamatorio que posiblemente se da en la IC puede estar relacionado y causar parte de la producción de ROS/RNS involucradas en los procesos patológicos que se dan en esta enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romero, C.S., C; Sandoya, E; Senra, H, ed. *Segundo consenso uruguayo de Insuficiencia Cardíaca*. 2000, Sociedad Uruguaya de Cardiología.
2. Paresch, A.C., MR, *Epidemiology and pathophysiology of heart failure*. Medicine, 2006. **34**(6): p. 210-214.
3. Francis, G.S., *Pathophysiology of chronic heart failure*. Am J Med, 2001. **110 Suppl 7A**: p. 37S-46S.
4. Bleumink, G.S., et al., *Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study*. Eur Heart J, 2004. **25**(18): p. 1614-9.
5. Krum, H.A., WT, *Heart Failure*. Lancet, 2009. **373**: p. 941-955.
6. Ho, K.K., et al., *The epidemiology of heart failure: the Framingham Study*. J Am Coll Cardiol, 1993. **22**(4 Suppl A): p. 6A-13A.
7. Cowie, M.R., et al., *Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study*. Eur Heart J, 1999. **20**(6): p. 421-8.
8. Levy, D., et al., *Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure*. N Engl J Med, 2002. **347**(18): p. 1397-402.
9. Sharpe, N. and R. Doughty, *Epidemiology of heart failure and ventricular dysfunction*. Lancet, 1998. **352 Suppl 1**: p. SI3-7.
10. McMurray, J.P., MA, ed. *Heart failure*. Vol. 365. 2005, Lancet. 1877–89.
11. Lip, G.Y., C.R. Gibbs, and D.G. Beevers, *ABC of heart failure: aetiology*. BMJ, 2000. **320**(7227): p. 104-7.
12. Haydock, P.C., MR *Heart failure: classification and pathophysiology*. Heart muscle disease, 2010.
13. Jackson, G., et al., *ABC of heart failure. Pathophysiology*. BMJ, 2000. **320**(7228): p. 167-70.
14. Iwase, M., et al., *Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac GS alpha overexpression*. Circ Res, 1996. **78**(4): p. 517-24.
15. Francis, G.S., K.M. McDonald, and J.N. Cohn, *Neurohumoral activation in preclinical heart failure. Remodeling and the potential for intervention*. Circulation, 1993. **87**(5 Suppl): p. IV90-6.
16. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 569-82.
17. Mann, D.L., *Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach*. Circulation, 1999. **100**(9): p. 999-1008.
18. Weber, K.T. and C.G. Brilla, *Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system*. Circulation, 1991. **83**(6): p. 1849-65.
19. Hunt, S.A., et al., *ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of*

- Heart Failure*): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*, 2005. **112**(12): p. e154-235.
20. McMurray, J.J., et al., *ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *Eur J Heart Fail*, 2012. **14**(8): p. 803-69.
 21. Association, T.C.C.o.t.N.Y.H., *Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels*. 9th edition ed1994, Boston: Little Brown & Co. 3.
 22. Lane, N., *Oxygen, the Molecule that made the World*. 2002: Oxford University Press. 384.
 23. Fukai, T. and M. Ushio-Fukai, *Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **15**(6): p. 1583-606.
 24. Szabo, C., H. Ischiropoulos, and R. Radi, *Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics*. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(8): p. 662-80.
 25. Kowaltowski, A.J., et al., *Mitochondria and reactive oxygen species*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **47**(4): p. 333-43.
 26. Medinas, D.B., et al., *The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer*. *IUBMB Life*, 2007. **59**(4-5): p. 255-62.
 27. Miyamoto, O.A.a.S., *Oxygen radicals and related species*, in *Principles of Free Radical Biomedicine*, K.P.a.H.M. Schipper, Editor 2011, Nova Science Publishers: Nueva york. p. 19-42
 28. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(1): p. 315-424.
 29. Silvina Bartesaghi, N.R.a.R.R., *Nitric oxide and derived oxidants*, in *Principles of Free Radical Biomedicine*, K.P.a.H.M. Schipper, Editor 2011, Nova Science Publishers: Nueva York. p. 43-74
 30. Radi, R., Denicola, A., Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G. and Rubbo, H, *The Biological Chemistry of Peroxynitrite*, in *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, L.J. Ignarro, Editor 2000, Academic Press: USA. p. 57-82.
 31. Filippin, L.I., et al., *Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis*. *Clin Exp Immunol*, 2008. **152**(3): p. 415-22.
 32. Jones, D.P., *Redefining oxidative stress*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(9-10): p. 1865-79.
 33. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. **39**(1): p. 44-84.
 34. Dalle-Donne, I., et al., *Biomarkers of oxidative damage in human disease*. *Clin Chem*, 2006. **52**(4): p. 601-23.
 35. Ungvari, Z., et al., *Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005. **3**(3): p. 221-9.
 36. Nakamura, K., et al., *Relationship between oxidative stress and systolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy*. *J Card Fail*, 2005. **11**(2): p. 117-23.

37. Mak, S. and G.E. Newton, *The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure: radical thoughts*. Chest, 2001. **120**(6): p. 2035-46.
38. Keith, M., et al., *Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(6): p. 1352-6.
39. Santos, C.X., et al., *Redox signaling in cardiac myocytes*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(7): p. 777-93.
40. Cesselli, D., et al., *Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy*. Circ Res, 2001. **89**(3): p. 279-86.
41. Dhalla, A.K., M.F. Hill, and P.K. Singal, *Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure*. J Am Coll Cardiol, 1996. **28**(2): p. 506-14.
42. Shiomi, T., et al., *Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice*. Circulation, 2004. **109**(4): p. 544-9.
43. Ide, T., et al., *Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium*. Circ Res, 1999. **85**(4): p. 357-63.
44. White, M., et al., *Increased systemic inflammation and oxidative stress in patients with worsening congestive heart failure: improvement after short-term inotropic support*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(4): p. 483-9.
45. McMurray, J., et al., *Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans*. Eur Heart J, 1993. **14**(11): p. 1493-8.
46. Heymes, C., et al., *Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(12): p. 2164-71.
47. Cingolani, H.E., et al., *The effect of xanthine oxidase inhibition upon ejection fraction in heart failure patients: La Plata Study*. J Card Fail, 2006. **12**(7): p. 491-8.
48. Tsutsui, H., S. Kinugawa, and S. Matsushima, *Oxidative stress and heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(6): p. H2181-90.
49. Kuroda, J. and J. Sadoshima, *NADPH oxidase and cardiac failure*. J Cardiovasc Transl Res, 2010. **3**(4): p. 314-20.
50. Akki, A., et al., *NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(1): p. 15-22.
51. Brandes, R.P., N. Weissmann, and K. Schroder, *NADPH oxidases in cardiovascular disease*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(5): p. 687-706.
52. Li, J.M., et al., *Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure*. Hypertension, 2002. **40**(4): p. 477-84.
53. Octavia, Y., H.P. Brunner-La Rocca, and A.L. Moens, *NADPH oxidase-dependent oxidative stress in the failing heart: From pathogenic roles to therapeutic approach*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(2): p. 291-7.
54. Berry, C.E. and J.M. Hare, *Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications*. J Physiol, 2004. **555**(Pt 3): p. 589-606.
55. Ukai, T., et al., *Allopurinol enhances the contractile response to dobutamine and exercise in dogs with pacing-induced heart failure*. Circulation, 2001. **103**(5): p. 750-5.
56. Farquharson, C.A., et al., *Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure*. Circulation, 2002. **106**(2): p. 221-6.

57. Jain, K., *Role of Nitric Oxide in Cardiovascular Disorders*, in *Applications of Biotechnology in Cardiovascular Therapeutics*, K. Jain, Editor 2011, Humana Press: Basel, Switzerland. p. 57-90.
58. Nediani, C., et al., *Nitric oxide/reactive oxygen species generation and nitroso/redox imbalance in heart failure: from molecular mechanisms to therapeutic implications*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(2): p. 289-331.
59. Zhang, Y., et al., *Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(8): p. 1531-40.
60. Stamler, J.S., S. Lamas, and F.C. Fang, *Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism*. Cell, 2001. **106**(6): p. 675-83.
61. Tsutsui, H., S. Kinugawa, and S. Matsushima, *Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(3): p. 449-56.
62. Cadenas, E., et al., *Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria*. Arch Biochem Biophys, 1977. **180**(2): p. 248-57.
63. Nojiri, H., et al., *Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration*. J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33789-801.
64. Tsutsui, H., *Mitochondrial oxidative stress and heart failure*. Intern Med, 2006. **45**(13): p. 809-13.
65. Tsutsui, H., T. Ide, and S. Kinugawa, *Mitochondrial oxidative stress, DNA damage, and heart failure*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1737-44.
66. Frei, B., R. Stocker, and B.N. Ames, *Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(24): p. 9748-52.
67. Young, I.S. and J.V. Woodside, *Antioxidants in health and disease*. J Clin Pathol, 2001. **54**(3): p. 176-86.
68. Halliwell, B., *Antioxidants in human health and disease*. Annu Rev Nutr, 1996. **16**: p. 33-50.
69. Annika Höhn, T.J., Stefanie Grimm and Tilman Grune, *Protein oxidation*, in *Principles of Free Radical Biomedicine*, K.P.a.H.M. Schipper, Editor 2011, Nova Science Publishers: Nueva York. p. 113-136
70. Stadtman, E.R., *Role of oxidant species in aging*. Curr Med Chem, 2004. **11**(9): p. 1105-12.
71. Peluffo, G. and R. Radi, *Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(2): p. 291-302.
72. Khaket, T.P. and R. Ahmad, *Biochemical studies on hemoglobin modified with reactive oxygen species (ROS)*. Appl Biochem Biotechnol, 2011. **164**(8): p. 1422-30.
73. Rifkind, J.M., et al., *Redox reactions of hemoglobin*. Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(3): p. 657-66.
74. Strobel, N.A., et al., *Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease*. Int J Cardiol, 2011. **147**(2): p. 191-201.
75. Rao, K.S., *Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders*. Indian J Biochem Biophys, 2009. **46**(1): p. 9-15.
76. Ravanat, J.-L., *DNA oxidation*, in *Principles of Free Radical Biomedicine*, K.P.a.H.M. Schipper, Editor 2011, Nova Science Publishers: Nueva York. p. 185-200

77. Go, Y.M. and D.P. Jones, *Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(4): p. 495-509.
78. Shao, D., et al., *Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(3): p. 550-8.
79. Elahi, M.M., K.M. Naseem, and B.M. Matata, *Nitric oxide in blood. The nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease*. FEBS J, 2007. **274**(4): p. 906-23.
80. Seddon, M., Y.H. Looi, and A.M. Shah, *Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure*. Heart, 2007. **93**(8): p. 903-7.
81. Siwik, D.A., P.J. Pagano, and W.S. Colucci, *Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(1): p. C53-60.
82. Siwik, D.A. and W.S. Colucci, *Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium*. Heart Fail Rev, 2004. **9**(1): p. 43-51.
83. von Harsdorf, R., P.F. Li, and R. Dietz, *Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis*. Circulation, 1999. **99**(22): p. 2934-41.
84. van Empel, V.P., et al., *Myocyte apoptosis in heart failure*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(1): p. 21-9.
85. Nishida, K. and K. Otsu, *Cell death in heart failure*. Circ J, 2008. **72 Suppl A**: p. A17-21.
86. Burgoyne, J.R., et al., *Redox signaling in cardiac physiology and pathology*. Circ Res, 2012. **111**(8): p. 1091-106.
87. Saavedra, W.F., et al., *Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart*. Circ Res, 2002. **90**(3): p. 297-304.
88. Grieve, D.J., et al., *Involvement of the nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase isoform Nox2 in cardiac contractile dysfunction occurring in response to pressure overload*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(4): p. 817-26.
89. Murdoch, C.E., et al., *NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 208-15.
90. Umar, S. and A. van der Laarse, *Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart*. Mol Cell Biochem, 2010. **333**(1-2): p. 191-201.
91. Alvarez, B., et al., *Formation and reactions of sulfenic acid in human serum albumin*. Methods Enzymol, 2010. **473**: p. 117-36.
92. Benzie, I.F. and J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Anal Biochem, 1996. **239**(1): p. 70-6.
93. Miranda, K.M., M.G. Espey, and D.A. Wink, *A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite*. Nitric Oxide, 2001. **5**(1): p. 62-71.
94. Winterbourn, C.C., *Oxidative reactions of hemoglobin*. Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 265-72.
95. Turell, L., et al., *Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment*. Braz J Med Biol Res, 2009. **42**(4): p. 305-11.
96. van Faassen EE, B.S., Feelisch M, Hogg N, Kelm M, Kim-Shapiro DB, Kozlov AV, Li H, Lundberg JO, Mason R, Nohl H, Rassaf T, Samouilov A, Slama-Schwok A, Shiva S, Vanin

AF, Weitzberg E, Zweier J, Gladwin MT., *Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology*. Med Res Rev., 2009. **29**(5): p. 683-741.