

**EVALUACIÓN DEL 4-HIDRÓXINONENAL COMO INDICADOR BIOQUÍMICO DE
DAÑO OXIDATIVO EN LA FASE AGUDA DEL INFARTO AL MIOCARDIO**

MANUEL BARRIOS S

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
BUCARAMANGA**

2011

**EVALUACIÓN DEL 4-HIDRÓXINONENAL COMO INDICADOR BIOQUÍMICO DE
DAÑO OXIDATIVO EN LA FASE AGUDA DEL INFARTO AL MIOCARDIO**

Presentado por:

MANUEL BARRIOS S

TRABAJO DE GRADO presentado como requisito para optar al título de
MAGÍSTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

Director

Dr. Gerardo Muñoz

Codirector

Rodrigo Torres

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE MEDICINA

BUCARAMANGA

2011

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a Manuel, Yamile y Jennifer que son el sustento emocional que me permite seguir adelante profesionalmente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al especialmente a aquellas personas que a pesar de su enfermedad deciden colaborar con el desarrollo del conocimiento y a todas las instituciones a través de empleados relacionados hicieron posible que estos resultados hallan podido alcanzar el dominio público.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	20
1.1. La enfermedad coronaria	20
1.1.1. La aterosclerosis	21
1.1.2. Formación de la placa de ateroma	24
1.1.3. Ruptura de la placa	25
1.1.4. Ruptura de la placa: manifestaciones clínicas	26
1.1.5. Síndrome coronario agudo.	27
1.2. Marcadores bioquímicos.	30
1.2.1. Biomarcadores de inflamación	31
1.2.2. Biomarcadores de estrés oxidativo	32
1.2.3. Biomarcadores de remodelamiento de la matriz extracelular	33
1.2.4. Biomarcadores de estrés de los miocitos	34
1.2.5. Biomarcadores de lesión de los miocitos	38
1.3. Estrés oxidativo	40
1.3.1. Estrés oxidativo en los síndromes coronarios agudos	43
1.4. Métodos para medir estrés oxidativo	44
1.4.1. DNA y ácidos nucleicos	45
1.4.2. Lípidos	46
1.4.3. Proteínas	46
1.5. Peroxidación de lípidos.	47
1.5.1. 4-Hidroxinonenal	52
1.5.2. Rol fisiopatológico del HNE	54
1.5.3. 4-HNE y NT-proBNP	55

2. MATERIALES Y MÉTODOS	59
2.1. Selección de los pacientes y obtención de las muestras	59
2.1.1. Grupo de estudio	59
2.1.2. Muestras Biológicas	61
2.1.3. Consideraciones éticas	62
2.2. Métodos experimentales	62
2.2.1. Preparación del derivado estándar 2,4-dinitrofenilhidrazona.	62
2.2.2. Preparación de la muestra para medición de 4HNE	65
2.3. Métodos analíticos	68
2.3.1. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	68
2.3.2. Análisis confirmación HNE-DNPH (HPLC/MS)	69
2.3.3. Análisis de NTproBNP por quimioluminiscencia.	70
2.3.4. Biometría sanguínea.	70
2.4. Análisis de datos	72
3. RESULTADOS	74
3.1. Determinación de HNE por HPLC	74
3.2. Confirmación del HNE-DNPH por espectrometría de masas.	76
3.3. Análisis pareado por grupos de observación.	80
3.3.1. Variables cualitativas y características generales de la población	80
3.3.2. Variables cuantitativas	81
3.4. Comportamiento de los valores de HNE respecto a las variables del estudio en los pacientes con IAM.	86
3.4.1. Variables cualitativas: condiciones de base de la población.	86
3.4.2. Variables cuantitativas	88
3.5. Estudios complementarios	91
3.5.1. Localización del infarto	91
3.5.2. Tamaño del Infarto	92

4. DISCUSIÓN	95
5. CONCLUSIONES	99
6. RECOMENDACIONES	100
7. ESTRATEGIAS DE PUBLICACIÓN	102
8. BIBLIOGRAFÍA	103
ANEXOS	113

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.1. Clasificación de la American Heart Association de las lesiones ateroscleróticas humanas. Mecanismos de desarrollo de la placa y la correlación clínica.	23
Tabla 1.2. Criterios para el biomarcador de daño oxidativo ideal. Tomado de Tsimikas S. (7).	33
Tabla 1.3. Marcadores Bioquímicos en SCA y de lesión de los miocitos más usados en la práctica clínica. Tomado de Bueno Y. (23).	39
Tabla 1.4 Metabolitos del oxígeno radicalarios y no radicalarios*	42
Tabla 3.1. Comparación de las variables del estudio por grupo de intervención.	83
Tabla 3.2. Análisis bi-variado entre las condiciones de base de la población y las concentraciones de HNE en los pacientes con IAM.	87
Tabla 3.3. Análisis de correlación entre los niveles plasmáticos de HNE y NTproBNP según las variables cuantitativas del estudio en las pacientes que presentaron IAM.	90
Tabla 3.4. Localización del infarto agudo del miocardio	91
Tabla 3.5. Tamaño del infarto de acuerdo a los niveles de HNE, complicaciones y desenlaces fatales a los 6 meses de seguimiento.	92

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. Ruptura de la placa aterosclerótica coronaria y las vías fisiopatológicas relacionadas, tomado de Rosenson, R.R. et al. JAMA 1998; 279:1643-1650.	26
Figura 1.2. Diagrama de la clasificación de los síndromes coronarios agudos.	29
Figura 1.3. Interferencia en el balance (flecha larga) entre agentes oxidantes y reductores que definen las condiciones de estrés oxidativo (o estrés reductivo). Adaptado de Kohen 2002 (33).	41
Figura 1.4. Clasificación de los métodos usados para determinar y cuantificar estrés oxidativo. Adaptado de Kohen (33).	47
Figura 1.5. Ilustración que muestra las ecuaciones que describen las etapas del proceso de lipoperoxidación lipídica. 1. Iniciación, 2. Propagación, 3. Terminación y 4. Formación de aductos. Tomado de Wheatley R.A. (70).	50
Figura 1.6. Ruta de la peroxidación de lípidos, se toma como ejemplo el malondialdehído (MDA) que es formado de una fracción del 1, 4, 7-octatrieno.	52
Figura 2.1. Flujograma del proceso de selección, estudio y seguimiento de los participantes (casos y controles) en el estudio.	61
Figura 2.2. Esquema que muestra la determinación por separación de los derivados de la DNPH usando TLC. El derivado estándar HNE-DNPH sintetizado de fue recuperado de la zona I a 5-6 cm del inicio aproximadamente ($R_f=0.5$).	64
Figura 2.3. Representación del proceso de extracción, manejo y procesamiento de las muestras sanguíneas hasta la derivatización con DNPH.	66

Figura 2.4. Representación de la preparación de la muestra por cromatografía de columna hasta su identificación y cuantificación de HNE-DNPH por HPLC, realizados por comparación de los tiempos de retención y la altura del pico de los cromatogramas de la muestra, con los de las soluciones estándar del conjugado.	68
Figura 3.1. Cromatogramas integrados del estándar HNE-DNPH y de la muestra de un paciente con IAM.	75
Figura 3.2. Cromatogramas por análisis con HPLC de las muestras de un paciente con IAM y un paciente control.	76
Figura 3.3. Espectro de masas de la solución patrón HNE-DNPH sintetizada, y luego purificada por TLC, bajo ionización negativa.	77
Figura 3.4. Espectro de masas bajo ionización positiva de la solución patrón HNE-DNPH sintetizada, y luego purificada por TLC.	78
Figura 3.5. Picos de fragmentación del ion molecular identificado en modo positivo.	79
Figura 3.6. Picos de fragmentación del ion molecular identificado en modo negativo.	79
Figura 3.7. Distribución de los niveles de HNE por grupo de observación.	85
Figura 3.8. Distribución de los niveles de NTproBNP por grupo de observación.	86
Figura 3.9. Distribución de los niveles de HNE en plasma de los pacientes infartados de acuerdo con el tamaño del infarto	94

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 2.1. Criterios para determinar del sistema de puntuación de escala del QRS según Selvester/Wagner (90).	72

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A.1. Curva de calibración realizada con patrón sintético HNE-DNPH	113

RESUMEN

Título: EVALUACIÓN DEL 4-HIDRÓXINONENAL COMO INDICADOR BIOQUÍMICO DE DAÑO OXIDATIVO EN LA FASE AGUDA DEL INFARTO AL MIOCARDIO.*

Autor: Manuel Barrios Socarras.**

Palabras clave: Peroxidación de lípidos, 4-hidroxinonenal, HPLC, biomarcadores, Síndrome coronario agudo.

Descripción:

El infarto agudo del miocardio (IAM) es la primera causa de muerte en nuestro país. Los eventos inflamatorios, locales y sistémicos que ocurren en el IAM han permitido identificar marcadores que ayuden al diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Existe la necesidad de explorar la utilidad de marcadores biológicos. El NTproBNP ha sido ampliamente estudiado como biomarcador de gran valor pronóstico, indicando estrés mecánico del cardiomiocito. Por otro lado el 4-Hidroxinonenal, un destacado marcador de daño oxidativo de gran interés en medicina. Se realizó un estudio observacional, donde se evaluaron los niveles de 4HNE por HPLC, en 22 participantes con diagnóstico de IAM, a través de su identificación y cuantificación por HPLC, asociados con el tamaño del infarto medido por electrocardiografía y los niveles de: NTproBNP, troponina T y CPKMB (quimioluminiscencia); comparándolos con las de 20 participantes sin evidencia de enfermedad coronaria aguda. Las concentraciones plasmáticas de HNE resultaron ser mayores en comparación con los sanos (2.24 μM , vs. 0.78 μM ; $p=0.0003$), niveles plasmáticos de HNE se elevaron proporcionalmente a las de NTproBNP ($r^{\text{sp}} = 0.68$, $p = 0.0005$, $n = 22$), del mismo modo sucedió con la troponina T y la CPKMB. El tamaño del infarto exhibió correlación positiva respecto a los niveles plasmáticos de HNE ($r^{\text{sp}} = 0.931$, $p < 0.001$). La concentración de HNE en plasma en la fase aguda del infarto al miocardio se encontró asociada al daño oxidativo del cardiomiocito, y debería considerarse su utilidad como biomarcador en el IAM para futuros estudios.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud – Escuela de Medicina – Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas – Director Muñoz Mantilla, Gerardo.

SUMMARY

Title: 4-HIDROXYNONENAL AS OXIDATIVE DAMAGE INDEX IN ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION.*

Author: Manuel Barrios Socarras.**

Keywords: lipid peroxidation, 4-hydroxinonenal, HPLC, acute coronary syndrome.

Description:

Acute myocardial infarction (AMI) is the leading cause of death in the world. Local and systemic inflammatory events taking place in AMI have let to identify biological markers in the diagnosis, prognostic, treatment and disease stratification. In this way, NTproBNP has been one of the broadly studied biomarkers, evidencing mechanical stress of the cardiomyocyte. 4-Hidroxinonenal (HNE) is a lipid peroxidation product that has gained increasing interest in medicine, especially for its physiological and pathological relevance. However, there is not enough scientific evidence for recommending HNE as a possible biomarker in AMI. This is an observational study, we evaluated HNE plasma concentration measured by HPLC in 22 subjects with diagnosis of AMI, associated with NTproBNP (quantified by chemiluminiscence), Troponine T, CPKMB plasma values and Infarct size measured electrocardiographically. HNE and NTproBNP plasma concentrations were also compared in AMI patients against a control group comprised by 20 subjects without evidence of acute coronary artery disease. HNE plasma concentrations resulted to be higher compared with controls (2.24 μM , vs. 0.78 μM ; $p=0.0003$), HNE plasma levels rose in similar proportions to NTproBNP ($r^{\text{sp}} = 0.68$, $p = 0.0005$, $n = 22$), also did it with troponine T and CPKMB plasma concentration. Infarct size displayed a positive linear correlation with plasma HNE levels ($r^{\text{sp}} = 0.931$, $p < 0.001$). Plasma HNE values measured in the acute phase of myocardial infarction are associated with cardiomyocyte oxidative damage, and it should be consider in deep analysis for further studies its usefulness as biomarker in acute coronary syndromes.

* Thesis

** Faculty of Health –School of Medicine– Mastery in Basic Biomedical Science – Director Muñoz Mantilla, Gerardo

INTRODUCCIÓN

El impacto de la enfermedad arterial coronaria y sus complicaciones son un problema de salud pública mundial con altas repercusiones socioeconómicas. Cerca de 1'500.000 personas sufren un episodio de Infarto Agudo de Miocardio (IAM) cada año en los Estados Unidos. El porcentaje de mortalidad es del 30% ocurriendo en su mayoría antes de llegar al hospital, de las cuales la mitad corresponden a IAM (1). Según el informe sobre la situación de la salud en Colombia del año 2007 la enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en hombres y mujeres mayores de 45 años, superando las tasas combinadas de muertes violentas y cánceres (2). Es prioritario buscar mejores herramientas diagnósticas que permitan ofrecer tratamientos oportunos en enfermedad coronaria y sus complicaciones.

Los síndromes coronarios agudos (SCA) surgen como complicación de la aterosclerosis que es un proceso crónico que presenta unas características y una clasificación bien establecida (Tabla 1.1). Los SCA pueden manifestarse en un grupo patologías divididas clínica y electro-cardiográficamente en tres condiciones de diferente grado de severidad: angina inestable, infarto sin elevación del ST (NSTEMI) e infarto con elevación de (STEMI). El diagnóstico de STEMI es electrocardiográfico y es realizado inmediatamente, sin embargo el diagnóstico de NSTEMI y angina inestable requieren de biomarcadores y conlleva más tiempo hasta la realización del diagnóstico definitivo. La gravedad y necesidad del oportuno tratamiento en el NSTEMI hacen a esta condición de vital enfoque sobre la investigación de nuevas herramientas diagnósticas que optimicen su identificación.

Varios procesos inflamatorios locales y sistémicos intervienen en la progresión de la aterosclerosis y sus complicaciones (3, 4). Los eventos de origen inflamatorio y

no inflamatorio suceden antes y después de un evento isquémico agudo. La búsqueda de biomarcadores contribuye al diagnóstico oportuno y sirven como pronóstico de complicaciones a corto y largo plazo, a la vez que son útiles en la clasificación de su severidad y riesgo. Las proteínas relacionadas con inflamación o funcionamiento cardíaco como proteína C reactiva, fibrinógeno plasmático, miosina y NT-proBNP entre otros, son utilizadas en el síndrome coronario agudo como indicadores de disfunción cardíaca. Su medición se usa para estratificación, monitoreo terapéutico y pronóstico de la enfermedad (5-7). En la práctica clínica no usan biomarcadores diferentes de las proteínas, que pudiesen ofrecer pruebas más sensibles y específicas como sería el caso de productos finales de la degradación oxidativa de los lípidos, tales como los aldehídos, los hidrocarburos y las cetonas entre otros.

Varios aldehídos son generados de manera endógena. Sin embargo, estos productos del proceso de la peroxidación de lípidos se encuentran involucrados con algunos de los efectos fisiopatológicos asociados con el estrés y daño oxidativo en las células y los tejidos. A diferencia de las especies reactivas de oxígeno, los aldehídos presentan una vida media más larga, por ello tienen la capacidad de migrar más allá de su sitio de generación, llegando a atacar blancos intracelulares y extracelulares distantes de la fuente inicial de producción de los radicales libres. La peroxidación lipídica por sí sola es un amplificador para los radicales libres iniciales y los aldehídos reactivos generados en este proceso pueden actuar como segundos mensajeros tóxicos de la compleja reacción en cadena que se inicia, una vez que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de la membrana celular se convierten en hidroperóxidos lipídicos. Entre los diferentes aldehídos de mayor importancia en biomedicina son: el malondialdehído (MDA) y los 4-Hidroxi-2-nonenales, dentro de los cuales se destaca el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (8).

Los productos de la lipoperoxidación han sido campo de estudio en su posible papel como biomarcadores de daño oxidativo, asociándolos al diagnóstico y pronóstico en la enfermedad cardiovascular y severidad de enfermedad arterial coronaria (9 -11). El MDA durante el proceso isquemia/reperfusión es un buen indicador metabólico de lesión miocárdica que junto a otros medios diagnósticos, podría dar una idea inicial del tamaño de la lesión (12). El 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) ha sido recientemente descrito como un producto específico de la peroxidación lipídica de interés en medicina (13). Hasta el momento se desconoce su comportamiento como biomarcador no invasivo de daño celular por estrés oxidativo, en la fase aguda del infarto agudo del miocardio en humanos.

1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1. LA ENFERMEDAD CORONARIA

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en los países industrializados y en vía de desarrollo. La enfermedad coronaria es la manifestación más prevalente y se asocia con alta mortalidad y morbilidad. Las presentaciones clínicas de la enfermedad coronaria isquémica incluyen isquemia silente, angina de pecho estable, falla cardíaca, angina inestable, infarto agudo del miocardio y muerte súbita (14). La enfermedad coronaria se considera la pandemia más importante del siglo XXI con una mortalidad en 1996 de 15 millones de personas (29% de la mortalidad total), la cardiopatía isquémica fue responsable de la muerte de 7 millones de individuos. En Estados Unidos 60 millones de adultos padecen enfermedad cardiovascular, responsable de 42% de todas las muertes cada año, con un costo de \$218 billones de dólares. Sin embargo, el número absoluto de muertes atribuibles a enfermedad cardiovascular es mayor en países en vía de desarrollo en comparación con los más desarrollados (9 *versus* 3 millones) (15).

En Colombia la enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte a causa del envejecimiento de la población, la epidemia de la obesidad, la falta de implementación de estrategias de prevención y control subóptimo en los factores de riesgo, la no utilización de intervenciones de probada efectividad en el manejo del síndrome coronario agudo y la falta de conciencia sobre el problema (14). Los departamentos con mayores tasas de mortalidad por enfermedad coronaria en el 2008 fueron en su orden Caldas, Boyacá, Quindío y Tolima, y las menores fueron en Guainía y Vaupés” (14).

1.1.1. La aterosclerosis

El desempeño eficiente del músculo cardíaco está condicionado al aporte continuo de oxígeno obtenido de la sangre que viaja por las arterias coronarias. La *aterosclerosis* o acumulación durante años de depósitos de naturaleza lipídica y la posterior formación de placas de ateroma en las paredes arteriales, provoca el engrosamiento y endurecimiento de la pared vascular. La erosión y ruptura de estas placas ocasionan la formación de un trombo o coágulo que impide el flujo sanguíneo a través de la arteria, provocando isquemia o deficiencia de oxígeno, que es la causa de *síndromes coronarios agudos (SCA)* (4, 9).

La aterosclerosis es considerada una enfermedad inflamatoria. Las altas concentraciones de colesterol en plasma, particularmente aquellas relacionadas con la lipoproteína de baja densidad (LDL) y la alteración del transporte inverso del colesterol a través de la HDL, son unos de los principales factores de riesgo para la enfermedad. Los procesos de aterogénesis van inclusive mucho más allá que la acumulación de grasa en la pared arterial, representan una serie de respuestas celulares y moleculares que se asemejan más a una enfermedad inflamatoria (10).

Las versiones más recientes de la hipótesis de la aterosclerosis enfatizan sobre *la disfunción endotelial (DE)*, siendo el resultado de un proceso inflamatorio crónico en la arteria. Esta DE es posiblemente causada por la elevación de: (i) LDL modificadas, (ii) radicales libres liberados por diversas condiciones entre ellas se mencionan a: la HTA, la diabetes mellitus y el tabaquismo, (iii) concentraciones elevadas de homocisteína en plasma, (iv) microorganismos infecciosos tales como el herpes virus o la *Chlamydia pneumoniae*, y (v) la combinación de estos y otros factores (9).

La DE genera una respuesta compensatoria que altera las propiedades normales del endotelio, tales como: aumento de la permeabilidad y de la capacidad de adherir plaquetas y leucocitos, propiedades anticoagulantes y formación de moléculas vasoactivas, citoquinas y factores de crecimiento. Si ante esto, el estímulo inflamatorio no es retirado, continúa la respuesta inflamatoria estimulando la migración y proliferación de las células del músculo liso de forma que se mezclan con el área inflamada para formar una lesión intermedia. Luego estas respuestas pueden adelgazar la pared arterial, que compensa con una dilatación gradual (16). Esta respuesta es mediada por monocitos derivados de macrófagos y subtipos específicos de linfocitos T.

Los resultados de la perpetuación de la inflamación aumenta la cantidad de macrófagos y linfocitos. La activación de estas células lleva a la liberación de enzimas hidrolíticas, citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento (17), que pueden inducir daños subsecuentes y necrosis focal (18). De esta manera los ciclos de acumulación de células mononucleares, migración y proliferación de células musculares lisas; finalmente la formación de tejido fibroso lleva a un alargamiento y restructuración posterior de la lesiones. Así, se convierte en una capsula fibrosa rellena de grasa con un núcleo de tejido necrótico, a ésta se le llama una lesión complicada (22). En cierto punto la arteria no puede compensar más con dilatación y la lesión empieza a introducirse en la luz del vaso y a alterar el flujo coronario (tabla 1.1).

Tabla 1.1. Clasificación de la American Heart Association de las lesiones ateroscleróticas humanas. Mecanismos de desarrollo de la placa y la correlación clínica.

Nomenclatura histológica básica	Fases del empeoramiento progresivo	Mecanismo principal del desarrollo	Aparición más precoz	Correlación clínica
Lesión tipo I Macrófagos espumosos	I	Aumento del tamaño debido principalmente a la acumulación de lípidos	Desde el primer decenio	Clínicamente silente
Lesión tipo II: Estrías grasas	II			
Lesión tipo III: Intermedias	III			
Lesión tipo IV: Ateromas	IV	Incremento acelerado de músculo liso y colágeno	Desde el tercer decenio	Clínicamente silente o manifiesta
Lesión tipo V: Fibroateroma	V			
Lesión tipo VI: Complicada	VI	Trombosis, hematoma	Desde el cuarto decenio	

En consecuencia la *arterioesclerosis* se trata de una enfermedad lentamente progresiva que comienza en la infancia y tiene su máxima incidencia de los 45 y 60 años. De forma más general, el desarrollo de la arterioesclerosis presenta dos etapas evolutivas bien definidas. Las fases iniciales de formación de la placa de lípidos en las arterias, y la ruptura y posterior trombosis de la placa ya formada, que da lugar a la angina inestable, el infarto del miocardio y la muerte súbita (15).

1.1.2. Formación de la placa de ateroma

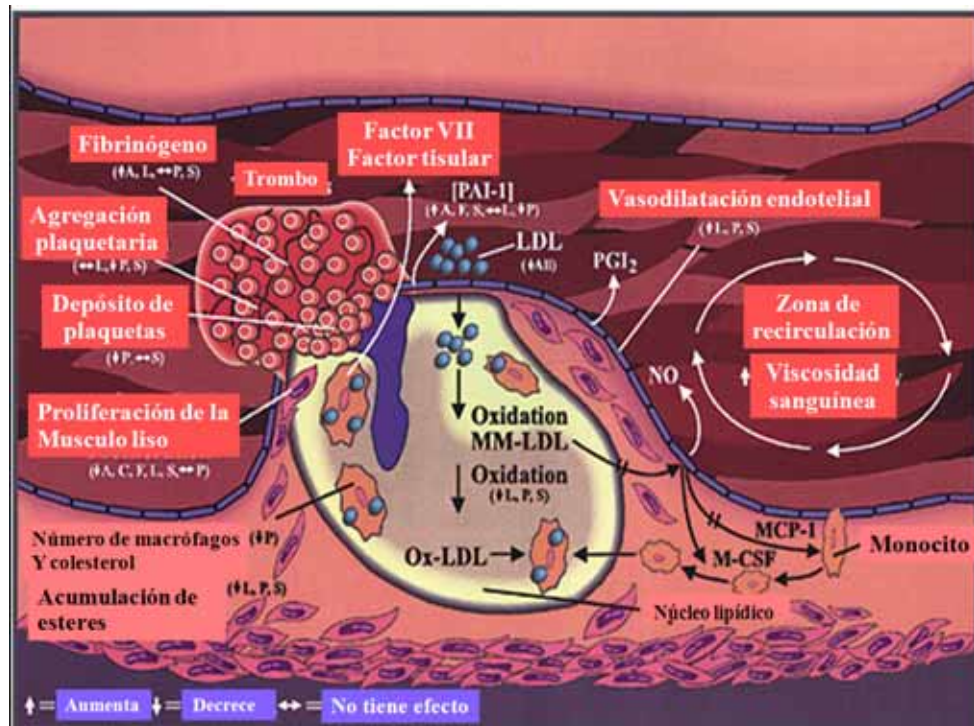
Las células endoteliales disfuncionales expresan moléculas de adhesión celular tipo selectinas que sintetizan y liberan citoquinas inflamatorias y proteínas quimiotácticas contribuyendo a la migración y penetración de monocitos y linfocitos T en la pared arterial (17). Una vez adheridos e introducidos en la íntima arterial los leucocitos participan del proceso inflamatorio, lo retroalimentan y perpetúan mediante fagocitosis de lipoproteínas modificadas por la oxidación (LDL oxidadas). Aparentemente no existe un mecanismo que regule el proceso de fagocitosis de lipoproteínas en los macrófagos, lo cual induce su degradación y posterior transformación en células espumosas, (*foam cells*) responsables de la aparición de estrías grasas (18). Un estudio del contenido de macrófagos en el tejido de la placa coronaria realizado a pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) estables e inestables, concluyó que aquellas áreas ricas en macrófagos son mayormente encontradas en pacientes con angina inestable e infarto agudo del miocardio sin elevación del segmento ST (19).

La lesión progresa con la migración alrededor del núcleo lipídico de las células musculares lisas de la pared arterial, que posteriormente conformarán la capa fibrosa de la placa de ateroma con la producción de proteínas de matriz como elastina, colágeno y proteoglicanos. Aunque estas proteínas refuerzan la placa y la protegen de la ruptura, se ha determinado que en placas vulnerables los linfocitos T liberan interferón gama en el seno de la placa. Este proceso inhibe la síntesis de colágeno por las células musculares lisas de la pared arterial, lo que limita su capacidad de renovar el colágeno que refuerza la cubierta de la placa haciéndola más frágil y susceptible a la ruptura (20 - 22).

1.1.3. Ruptura de la placa

La ruptura de la placa de ateroma se presenta por diversos factores. Se ha destacado la influencia de factores mecánicos que producen la ruptura y/o desgaste de la placa debido al impacto del flujo sanguíneo sobre ésta, así como factores biológicos concernientes a la inflamación y a la apoptosis de las células del tejido muscular liso (29). El proceso inflamatorio además de ser el promotor de la iniciación, progresión y posterior vulnerabilidad de las lesiones ateroscleróticas, contribuye decisivamente a la precipitación de las complicaciones trombóticas producto de la ruptura de la placa de ateroma. El macrófago activado, muy abundante en el ateroma, puede producir enzimas proteolíticas, como las metaloproteinasas matriciales (MMP), familia de más de 20 componentes que incluye colagenasas, gelatinasas y elastasas. Estas enzimas son capaces de degradar los componentes de la capa fibrosa protectora del ateroma, adelgazándola y debilitándola. (30). Una vez la placa aterosclerótica se rompe o se erosiona, la matriz subendotelial (núcleo lipídico, colágeno y factor tisular) se expone por lo que sobreviene la formación de un trombo no oclusivo abundante en plaquetas (10). De esta forma se activa la cascada de la coagulación, llevando a la formación de trombina, que demuestra tener un papel importante en la trombosis arterial (22), como se representa en la figura 1.1.

Figura 1.1. Ruptura de la placa aterosclerótica coronaria y las vías fisiopatológicas relacionadas, tomado de Rosenson, R.R. et al. JAMA 1998; 279:1643-1650.



1.1.4. Ruptura de la placa: manifestaciones clínicas

El principal mecanismo para la oclusión del flujo sanguíneo es la formación intraluminal de un trombo, pues la exposición del centro lipídico de la lesión y las fibras de colágeno, favorecen la formación del coágulo. La extensión de la exposición de los componentes de la placa, el grado de estenosis y la tendencia del sistema trombolítico son los factores más importantes al establecer el grado de la respuesta trombolítica ante la ruptura de la placa de ateroma. Si bien el tamaño de una placa es importante, no lo es menos su morfología y su tendencia a la ruptura y la trombosis. En definitiva, la presentación clínica depende de la

magnitud y lo abrupto de la ruptura de la placa, el tamaño del trombo, la vasoconstricción local y por ende, la duración de la obstrucción de flujo sanguíneo coronario, los cuales se manifiestan como una serie de síndromes clínicos de nominados síndromes coronarios agudos que poseen como denominador común el dolor precordial, dificultad respiratoria e irradiaciones inespecíficas del dolor al brazo izquierdo, mandíbula, región inter escapular entre los sitios más comunes.(4, 20, 21).

Adicionalmente, en la actualidad se considera la existencia de pacientes vulnerables que presentan de manera difusa placas, factores hemodinámicos y miocardio vulnerables (14). Además existen otros factores, cuya presencia está asociada con un incremento de la trombogenicidad de la sangre, tales como la elevación de los niveles séricos del cLDL, el tabaquismo, la hiperglucemia y la HTA, entre otros (22).

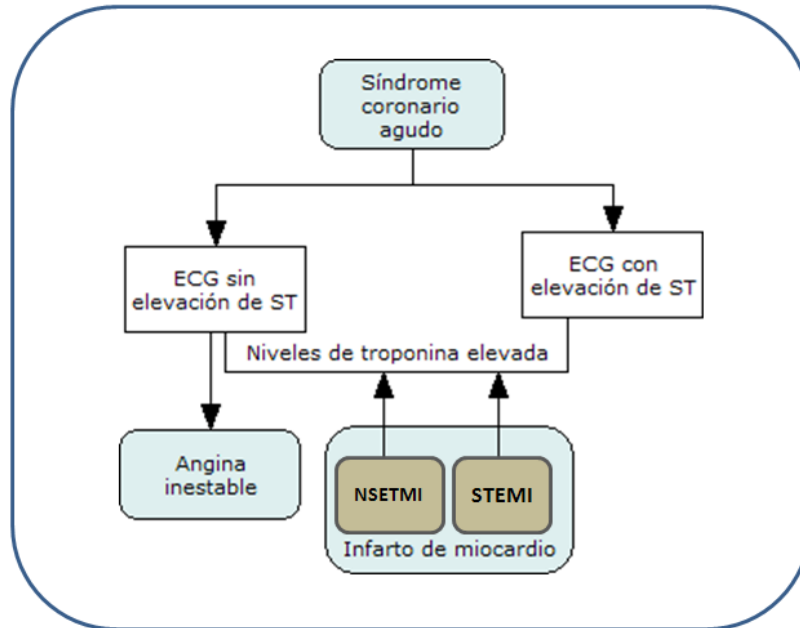
1.1.5. Síndrome coronario agudo.

El conjunto de manifestaciones de la cardiopatía isquémica o de la insuficiencia coronaria, que tienen como causa común la disminución del aporte de sangre oxigenada al miocardio, producto de la obstrucción parcial o total de las arterias coronarias, generalmente causada por placas de ateroma (por sí mismas o por la trombosis provocada por su ruptura), constituyen los *síndromes coronarios agudos* (SCA) y comprende tres grupos de alteraciones: *angina de pecho inestable*, cuando la isquemia no llega a provocar necrosis en el tejido miocárdico; el IAM sucede cuando la isquemia produce necrosis en una porción del miocardio; y la *muerte súbita*, cuando los impulsos eléctricos del corazón se alteran (taquicardia y/o fibrilación ventricular) provocando el disfunción cardíaca” (23).

1.1.5.1. Clasificación

Actualmente, la clasificación del IAM se realiza en el contexto del dolor torácico agudo. Dos presentaciones diferentes en los SCA son identificadas sobre la base de los hallazgos electrocardiográficos; tomando como base la distinción referente al segmento ST, que se mide desde el final del complejo QRS hasta el inicio de la onda T en el trazado del electrocardiograma (EKG). La desviación (elevación o depresión) del segmento ST respecto a la línea base, se considera el mejor indicador no invasivo para evaluar la presencia de un trastorno isquémico (24). De acuerdo con esto, la clasificación de los SCA incluye nueva información sobre su fisiopatología y manejo en dos presentaciones diferentes: SCA con elevación permanente del segmento ST y SCA sin elevación permanente de dicho segmento. (i) El SCA con elevación permanente del segmento ST, comprende el IAM, isquemia, daño tisular que usualmente lleva a un infarto Q, y tratamiento de reperfusión urgente. (ii) El SCA sin elevación de dicho segmento, pueden ser divididos en la angina inestable (AI), caracterizado por ausencia en la liberación de marcadores de muerte celular, considerado como un estado transitorio que finalmente produce angina de reposo y permite manejo ambulatorio, y (iii) el IAM sin elevación del segmento ST (NSTEMI) o infarto no Q, donde existe aumento de los marcadores de muerte de la célula miocárdica, con pronóstico dependiente de una terapia médica agresiva, angiografía coronaria temprana y revascularización tan pronto como sea posible (4) (figura 1.2).

Figura 1.2. Diagrama de la clasificación de los síndromes coronarios agudos.



Usualmente en los centros de atención en nuestro país, los pacientes con SCA sin elevación del ST son sometidos a terapia de reperfusión, sin establecer diagnóstico diferencial entre NSTEMI y una AI. Además del incremento en los gastos médicos al realizar esta intervención, este procedimiento se ha asociado con efectos adversos, producto de la activación de la cascada inflamatoria que se manifiesta con el deterioro funcional, arritmia y la progresión acelerada de la muerte celular (25). Mientras tanto, en los hospitales los pacientes con SCA sin elevación del ST deben esperar los resultados de los biomarcadores de daño miocárdico, que retrasan el tratamiento oportuno en unas 6 a 8 horas en el mejor de los casos, por este hecho los pacientes que padecen síndromes coronarios agudos sin elevación del ST son una zona intermedia de gran desafío diagnóstico que merece atención e investigación de nuevas herramientas que optimicen su detección. Actualmente la medición de los niveles de troponina constituye la herramienta de diagnóstico más efectiva. Sin embargo, se presentan dificultades

para establecer los valores positivos o negativos que determinen el diagnóstico de estos pacientes en un tiempo óptimo, ya que como se mencionó la elevación de sus niveles en el plasma se realiza de 6 a 8 horas posterior al evento isquémico, lo cual contribuye al aumento de la mortalidad asociada a esta patología (26).

1.2. MARCADORES BIOQUÍMICOS.

Un biomarcador es definido por el *Biomarkers Definitions Working Group* del Instituto Nacional de Salud y la *Food and Drug Administration* (NIH/FDA) de los estados unidos (27) como “una característica que es objetivamente medida y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas en una intervención terapéutica”. En general hay tres tipos de biomarcadores: (i) los usados para monitorear y diagnosticar la progresión de una enfermedad (14); (ii) biomarcadores de eficacia/toxicidad de un tratamiento específico (9) y (iii) marcadores farmacodinámicos para el monitoreo de respuestas farmacológicas (28). En cuanto a la estandarización de pruebas usando biomarcadores, se ha establecido que un biomarcador debe llenar tres criterios básicos: (i) disponibilidad de mediciones precisas y repetibles a un costo razonable y con resultados a cortos tiempos de entrega para el ámbito clínico, (ii) el biomarcador debería ofrecer información que no se encuentra disponible a través de un examen clínico cuidadoso; y (iii) la información derivada de las concentraciones expresadas deberían contribuir a la toma de decisiones médicas (37, 50).

En la casuística de SCA que presentan retos en el diagnóstico mediante los métodos convencionales, ha sido necesaria la utilización de múltiples biomarcadores, como sucede en el infarto sin elevación del segmento ST (23). En estos casos un diagnóstico válido y oportuno conlleva procedimientos dirigidos a restablecer el flujo sanguíneo de forma oportuna (4, 26). Han surgido

biomarcadores de inflamación, necrosis de los miocitos, estrés hemodinámico, daño vascular y de progresión de la arterioesclerosis, entre otros. Estas moléculas constituyen un medio no invasivo, útil en el entendimiento de las causas, consecuencias y repercusión de los SCA. Por estos hechos la estrategia de multi-biomarcadores podría convertirse en una gran herramienta que junto a los hallazgos físicos y electrocardiográficos podrían ayudar en la toma de decisiones en cuanto al diagnóstico y tratamiento de los SCA (5, 23).

1.2.1. Biomarcadores de inflamación

La proteína C reactiva (PCR) es una proteína de fase aguda sintetizada por hepatocitos en respuesta a la citoquina proinflamatoria interleucina 6. La elevación de sus niveles desencadena efectos adversos en el endotelio vascular debido a la reducción en la liberación de óxido nítrico, el incremento en la producción de endotelina-1 e inducción de expresión de moléculas de adhesión endotelial. Estos descubrimientos sugieren que la proteína C reactiva podría presentar un rol causal en la enfermedad vascular y por tanto convertirse en un blanco terapéutico. Sin embargo los niveles elevados de proteína C reactiva poseen baja especificidad por reacciones cruzadas con infecciones agudas o crónicas, consumo de cigarrillo y estados inflamatorios activos (29).

El *TNF- α* y las interleuquinas 1, 6 y 18 son consideradas citoquinas proinflamatorias producidas por las células nucleadas en el corazón, que hacen parte de las respuestas innatas al efecto estresante de una lesión cardiaca isquémica. La expresión de estas citoquinas se encuentra asociada con efectos deleterios en la función ventricular izquierda y contribuye a la presentación de complicaciones. El *TNF- α* causa dilatación ventricular izquierda, a través de la activación de metaloproteinasas que se asocian al deterioro de la función ventricular izquierda, y su medición junto con la Interluquina 18 podrían ser

usadas para predecir complicaciones en los SCA (31). Actualmente la medición de PCR, las citoquinas inflamatorias, el *TNF- α* y sus receptores parecen ser útiles en la estratificación de riesgo de complicaciones en el IAM. En el futuro se espera que el perfil de cambios en los biomarcadores inflamatorios permita ayudar a identificar anomalías inflamatorias específicas que permita guiar la terapéutica.

1.2.2. Biomarcadores de estrés oxidativo

El estrés oxidativo es producto de un desbalance entre las especies reactivas de oxígeno y los antioxidantes endógenos de los mecanismos de defensa. El desbalance provoca un profundo deterioro en la función endotelial, favoreciendo la progresión de la falla cardíaca (32), produciendo apoptosis o necrosis de los miocitos con aparición de arritmias y disfunción endotelial. Las *lipoproteínas de baja densidad oxidadas*, *malondialdehído* y *mieloperoxidasa* son marcadores indirectos de estrés oxidativo. La *xantina oxidasa* cataliza la producción de los oxidantes *hipoxantina* y la *xantina*, que participan en la disfunción endotelial, HTA, falla cardíaca, y que probablemente jueguen un rol patológico en el SCA (4, 34). En la tabla 1.2 se muestran los criterios definidos para considerar un biomarcador de evaluación del daño oxidativo.

Tabla 1.2. Criterios para el biomarcador de daño oxidativo ideal. Tomado de Tsimikas S. (7).

A)	<i>Criterio principal</i>
	El biomarcador debería ser predictivo para el desarrollo de la enfermedad
B)	<i>Criterios técnicos</i>
(i)	El biomarcador deberá detectar una mayor parte o al menos un porcentaje significativo del daño oxidativo que ocurre <i>in vivo</i> .
(ii)	El coeficiente de variación entre los diferentes ensayos de la muestra deberían ser pequeños en comparación con la diferencia inter sujetos.
(iii)	Sus niveles no deberían variar ampliamente en el mismo sujeto bajo la misma condición a diferentes tiempos.
(iv)	Debería emplear medidas tecnológicamente robustas
(v)	No debería ser influenciado por la dieta.
(vi)	Debería ser idealmente estable durante al almacenamiento, de modo que no se degrade ni se forme de <i>novo</i> en las muestras almacenadas.

1.2.3. Biomarcadores de remodelamiento de la matriz extracelular

El remodelamiento de los ventrículos desempeña un rol importante en la enfermedad coronaria, debido a que la matriz extracelular provee sostén para los miocitos en el tejido y determina también su tamaño y forma. Normalmente, existe un balance entre las *metaloproteinasas* de la matriz y los *inhibidores de los tejidos de metaloproteinasas*, que en caso de SCA, se genera un desequilibrio asociado a dilatación ventricular y remodelamiento. Los marcadores elevados de regeneración de matriz extracelular, y de síntesis de colágeno excesivo, generan

deterioro de la función ventricular izquierda. Actualmente, han sido identificadas 15 metaloproteínas de la matriz, y varias formas de procolágeno e inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (37) que son objeto de desarrollos terapéuticos.

1.2.4. Biomarcadores de estrés de los miocitos

La hipoxia tisular genera liberación de péptidos y proteínas en el miocardio que han sido evaluados en el diagnóstico de SCA. El NT-proBNP es una herramienta para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de insuficiencia cardíaca y evaluación de la disnea aguda (40). Su determinación conjunta mejora la sensibilidad de la prueba de esfuerzo en la detección de isquemias inducibles y puede inclusive utilizarse en la evaluación, monitoreo y pronóstico de la estenosis aórtica y el tromboembolismo pulmonar. Se usa también, en el tamizaje, estratificación, monitoreo y pronóstico de la insuficiencia cardíaca y el síndrome coronario agudo (40, 41).

El sistema del péptido natriurético se activa después de la lesión isquémica (44), por estiramiento miocárdico secundario a la disfunción ventricular izquierda y/o derecha. Adicionalmente la hipoxia celular y la isquemia estimulan su producción en ausencia de cambios hemodinámicos demostrables. Otros factores incluyen la frecuencia cardíaca, y una variedad de citoquinas proinflamatorias y neurohormonas con efectos vasoconstrictores, antidiuréticos, hipertróficos y citoproliferativos que pueden estimular la síntesis de péptido natriurético durante la isquemia (45).

La magnitud y la duración en el aumento de las concentraciones plasmáticas de NT-proBNP dependen proporcionalmente del tamaño y el grado de la disfunción ventricular izquierda. Las concentraciones circulantes son mayores en el infarto miocárdico anterior que en el inferior, y una variabilidad de patrón bifásico en la

secreción conjunta de BNP y de NT-proBNP (con un segundo pico de los días 2 a 5) podría ser común en pacientes con IM anterior que con el inferior (45). Por otro lado, algunos trabajos con animales y cultivos tisulares muestran que los mecanismos de secreción y degradación de los péptidos natriuréticos, son activados por endotoxinas y mediadores de la inflamación (38, 46, 47).

NT-proBNP en el diagnóstico de la enfermedad cardíaca.

El péptido natriurético cerebral (BNP) fue aislado inicialmente de extracto cerebro de cerdo, poco después se estableció como una hormona de origen cardiaco y con propiedades natriuréticas, que en conjunto con su homólogo el péptido natriurético auricular (ANP) (39) constituyen el sistema peptídico natriurético del corazón. BNP se sintetiza inicialmente como una prohormona de 108 aminoácidos llamado *proBNP*. Durante su secreción este propéptido es escindido en su molécula biológicamente activa el BNP (del aminoácido 77 al 108) que es rápidamente procesada y degradada en varios tipos de formas circulantes, y el remanente fragmento aminoterminal NT-proBNP (del aminoácido 1 al 76). El principal estímulo para la secreción de NT-proBNP es el estiramiento de los cardiomiocitos, sin embargo puede suceder como consecuencia del estímulo de hormonas (tales como las catecolaminas, la angiotensina II y la endotelina), y la hipoxia de origen miocárdico, los cuales en su conjunto reflejan disestrés cardiaco, que guarda relación proporcional con los niveles plasmáticos de proBNP, por lo que resulta de utilidad en el diagnóstico, pronóstico o monitoreo de varias entidades nosológicas relacionadas con esta característica. Por otro lado, esta molécula no está sujeta a depuración por parte de los receptores y enzimas localizadas en diversos tejidos, como sucede con la sustancia bioactiva, por lo que presenta una vida media más larga y concentraciones plasmáticas más estables que el BNP (38, 39). Tanto BNP como NT-proBNP tienen mecanismos de

depuración renal, por lo cual patologías como la insuficiencia renal crónica pueden mostrar altas concentraciones plasmáticas de ambos marcadores (42, 43).

Utilidad Clínica

El NT-proBNP se presenta como una importante herramienta para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de la insuficiencia cardíaca y en la evaluación de la disnea aguda (40). La determinación de NT-proBNP mejora la sensibilidad de la prueba de esfuerzo para detectar isquemias inducibles y también puede utilizarse en la evaluación, monitoreo y pronóstico de la estenosis aórtica y el tromboembolismo pulmonar, entre otras. En la actualidad, después de varios estudios, se visualiza con mayor claridad su utilidad en el tamizaje, estratificación, monitoreo y pronóstico de la insuficiencia cardíaca y el síndrome coronario agudo (40, 41). Por otro lado, el NT-proBNP ha mostrado inclusive ser un predictor de riesgo de muerte y de IAM en sujetos aparentemente normales y sin enfermedad cardíaca de base (93), de modo que se proyecta el NT-proBNP como medida de monitoreo en la población general, ya que promete en su utilidad para la detección de anomalías cardíacas funcionales y estructurales, así como la predisposición temprana de desarrollar futuros eventos cardiovasculares (94).

Se ha destacado la importancia del NT-proBNP como factor pronóstico de morbi-mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca, ya sea independientemente o asociada con otras pruebas. También se han demostrado relaciones entre las concentraciones sanguíneas de NT-proBNP y la respuesta terapéutica. En el síndrome coronario agudo el péptido natriurético es un indicador que proporciona información acerca del pronóstico en cuanto a disfunción cardíaca, por lo que su aplicación es de gran utilidad en la estratificación, monitoreo terapéutico y pronóstico de morbilidad y mortalidad (42, 43).

El sistema del péptido natriurético es rápidamente activado después de la lesión isquémica (44). El aumento en la producción de NT-proBNP después de episodios de isquemia aguda puede ser causado por una variedad de factores. El aumento del estiramiento miocárdico secundario a la disfunción ventricular izquierda y/o derecha por isquemia puede ser cuantitativamente el mayor estímulo. Sin embargo, la hipoxia celular y la isquemia pueden estimular también la producción de BNP y NT-proBNP en la ausencia de cambios hemodinámicos demostrables. Otros factores incluyen la frecuencia cardíaca, y una variedad de citoquinas proinflamatorias y neurohormonas con efectos vasoconstrictores, antidiuréticos, hipertróficos y citoproliferativos que pueden estimular la síntesis de péptido natriurético durante la isquemia (45).

Determinantes de los niveles de NT-proBNP

La magnitud y la duración en el aumento de las concentraciones plasmáticas de NT-proBNP después de un SCA dependen proporcionalmente del tamaño y el grado de la disfunción ventricular izquierda. Las concentraciones circulantes son mayores en el IAM anterior que en el inferior, y una variabilidad de patrón bifásico en la secreción conjunta de BNP y de NT-proBNP (con un segundo pico de los días 2 a 5) podría ser común en pacientes con IM anterior que con el inferior (45).

NT-proBNP y la inflamación

Hasta el momento hay poca literatura que trata el tema del BNP y la inflamación. Algunos trabajos de estudios con animales y de cultivos tisulares muestran un incremento en la evidencia que los mecanismos de secreción y degradación de los péptidos natriuréticos, son activados por endotoxinas y mediadores de la inflamación (38, 46, 47). Los estudios clínicos sugieren que los niveles de péptido natriurético están, al menos en parte, elevados en su producción o degradación

como respuesta a los mediadores inflamatorios. También se encontró que los mecanismos fisiopatológicos distintos de la disfuncionalidad cardíaca, pueden contribuir también al incremento de los niveles de BNP y NT-proBNP. Se ha encontrado relación entre los niveles del NT-proBNP y los marcadores inflamatorios en la fase aguda del infarto del miocardio, ambos factores relacionados con la extensión del infarto y con el pronóstico durante su estancia en la unidad de cuidados intensivos, así como también en su seguimiento a largo plazo (48).

1.2.5. Biomarcadores de lesión de los miocitos

Los marcadores bioquímicos de lesión de miocitos que actualmente se utilizan en la práctica clínica (ver figura 1.3):

- ✱ *Troponinas*: son proteínas globulares formadas por un complejo de tres subunidades, que se integran en la contracción muscular. Las *troponinas* se liberan cuando se lesiona el músculo cardíaco y constituyen un marcador específico y la mejor prueba diagnóstica que indica un infarto de miocardio. Sin embargo, el mayor inconveniente radica en el tiempo necesario para su aparición (49, 50).

- ✱ *Creatinfosfoquinasa (CPK)*: es una enzima intracelular. Se encuentra en el músculo esquelético, cardíaco y cerebro un aumento en la concentración en el suero, es índice de lesión celular. La extensión y gravedad de la lesión determina la magnitud de la elevación. valores por encima de 0,1 ng/mL son predictores de mortalidad e infarto en pacientes con angina inestable. El incremento de CPK puede producirse en numerosas situaciones no isquémicas, tales como la pericarditis, daño muscular esquelético y fracaso renal (50).

✳ La *mioglobina*: es una proteína presente en el músculo esquelético y cardíaco. Cuando se presenta un daño en el músculo, la mioglobina es liberada en el torrente sanguíneo y finalmente es excretada por la orina. El rango normal es de 0 a 85 ng/mL, niveles mayores indican IAM, inflamación, sangrado, isquemia y/o trauma del músculo cardíaco, entre otros (50).

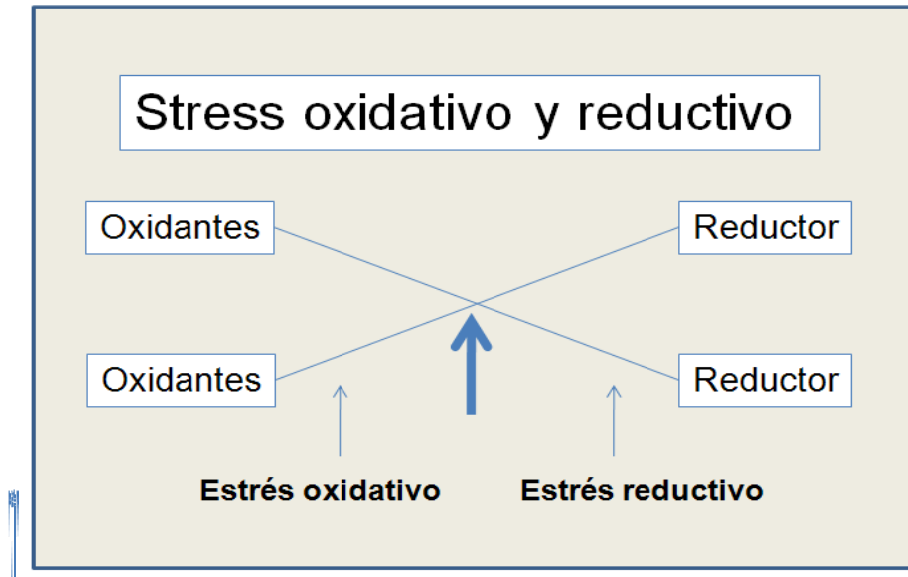
Tabla 1.3. Marcadores Bioquímicos en SCA y de lesión de los miocitos más usados en la práctica clínica. Tomado de Bueno Y. (23).

Marcador	Inicio de la elevación (Horas)	Duración (Horas)	Ventajas	Inconvenientes
<i>Troponina</i>	3-12	120-360 120-240	Mayor sensibilidad y especificidad Utilidad pronóstica y de selección terapéutica	Baja sensibilidad en fase precoz (<6h) Baja sensibilidad para detección de reinfartos pequeños
<i>CPK mb</i>	3-12	48-72	Detección de reinfartos	Baja especificidad Baja sensibilidad para IAM precoz o daño pequeño
<i>Mioglobina</i>	1-4	24	Sensibilidad alta Detección precoz Resultado negativo: descarta IAM	Muy baja especificidad

1.3. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es un término que hace referencia al desequilibrio entre la producción de oxidantes y la defensa orgánica (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión) (9), produciendo disparidad en el estado oxido-reducción de la célula. El oxígeno es la mayor fuente de oxidantes debido a su configuración electrónica, que favorece su reducción por la adición de un electrón generando especies altamente reactivas (ROS) tales como anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$). Un radical es una especie química con uno o más electrones desapareados en un orbital externo que inician reacciones en cadena, removiendo un electrón de alguna otra molécula tipo lípidos insaturados, carbohidratos, aminoácidos o ácidos nucleicos. La tercera molécula que se genera por la reducción paulatina del O_2 a H_2O es el peróxido de hidrógeno, un compuesto de baja reactividad relativa que difunde libremente a través de las membranas celulares, se descompone ante la presencia de iones metálicos reducidos como el Fe^{+2} a $\bullet OH$, que es un oxidante causante de daño en macromoléculas de la célula. La producción incontrolada de ROS o una reducción desequilibrada de antioxidantes es conocida como estrés oxidativo, y se piensa que es deletéreo por su alteración en la expresión génica, así como para la estructura y la función de las proteínas (28), tal como se representa en la figura 1.3.

Figura 1.3. Interferencia en el balance (flecha larga) entre agentes oxidantes y reductores que definen las condiciones de estrés oxidativo (o estrés reductor). Adaptado de Kohen 2002 (33).



Los hidroperóxidos (ROOH), generados en la peroxidación de lípidos por ejemplo, son descompuestos a radicales peroxilo (ROO^\bullet) o alcoxilo (RO^\bullet). Además de esto, las especies oxidantes pueden reaccionar entre ellas, generando oxidantes más potentes como sucede con el óxido nítrico (NO^\bullet), un agente reductor débil que ante la presencia de $\text{O}_2^{\bullet-}$ forma el agresivo oxidante peroxinitrito (ONOO^-), que más adelante se descompone a pH ácido para liberar pequeñas cantidades de $^\bullet\text{OH}$ de forma independiente de la presencia de metales de transición. El ácido hipocloroso (HOCl), un potente oxidante por sí mismo, puede reaccionar con $\text{O}_2^{\bullet-}$ o puede ser reducido por Fe^{+2} generando $^\bullet\text{OH}$. La mayoría son derivados del oxígeno, los tioles por ejemplo son reducidos a radicales tiolilos, que pueden reaccionar con varias biomoléculas al mismo tiempo que producen $\text{O}_2^{\bullet-}$ metales iónicos de transición reducidos. (51).

La evidencia actual sugiere que el estrés oxidativo constituye un factor etiológico de gran significado en el envejecimiento y en varias enfermedades degenerativas crónicas tales como aterosclerosis, cáncer, diabetes, falla renal crónica, daño por isquemia/reperfusión y algunas enfermedades nerviosas sistémicas. A pesar de esto, la medición de estrés oxidativo no hace parte de los exámenes de rutina que se realizan en los laboratorios clínicos hospitalarios (28).

Tabla 1.4 Metabolitos del oxígeno radicalarios y no radicalarios*

Nombre	Símbolo
Radicales de oxígeno	
Oxígeno (bi-radical)	$O_2^{\bullet\bullet}$
Ion superóxido	$O_2^{\bullet-}$
Hidroxilo	OH^{\bullet}
• Peroxilo	ROO^{\bullet}
Alcoxilo	RO^{\bullet}
Óxido nítrico	NO^{\bullet}
Derivados del oxígeno no radicalarios	
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Peróxido orgánico	$ROOH$
Ácido hipoclorico	$HOCl$
Ozono	O_3
Aldehídos	$HCOR$
Oxígeno singulete	1O_2
Peroxinitrito	$ONOOH$

*Adaptado de Kohen (33).

1.3.1. Estrés oxidativo en los síndromes coronarios agudos

Los procesos isquémicos en el corazón causan alteraciones en los mecanismos de defensa contra los radicales libres, principalmente una reducción en la actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial y la depuración del contenido tisular de glutatión reducido. Al mismo tiempo, la producción de ROS aumenta en la mitocondria y en las células del sistema inmune, condición que es exacerbada por la readmisión de oxígeno durante los eventos de reperfusión (52). La lesión tisular que acompaña al proceso isquemia/reperfusión miocárdica implica profundos cambios metabólicos. Lo primero en afectarse son las membranas biológicas. El daño se inicia con la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2), y la liberación de ácido araquidónico, que toma la vía de la 12-lipooxigenasa dentro del miocito, generando abundantes cantidades de ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico, el cual puede convertirse, en presencia de metales de transición como el Fe^{+2} , en una fuente importante de ROS especialmente el radical libre hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) (53). Éste a su vez, oxida a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas biológicas y otras biomoléculas, generando MDA e HNE como principales productos (54). Por otra vía, el óxido nítrico (ON) es producido a partir de la arginina por la enzima óxido nítrico sintetasa (ONS), que se presenta en dos formas, la constitutiva y la forma inducible. La primera está presente normalmente en el endotelio vascular y es responsable del valor basal del ON, producido por las células endoteliales, tal como lo confirman publicaciones que apoyan la existencia de un incremento en la biosíntesis de ON en corazones sometidos a isquemia (55). Cuando los tejidos son lesionados, como ocurre en el caso de la isquemia, el sitio de la lesión es infiltrado por neutrófilos, que poseen ONS inducible, produciendo abundantes cantidades de ON, lo que puede causar citotoxicidad en lugar de citoprotección al inhibir las ferrosulfoproteínas de la cadena respiratoria, disminuyendo la producción de energía ya escasa en los cardiomiocitos y, en consecuencia, la eficiencia mecánica del corazón. Debido a la alta reactividad

química que le confiere su naturaleza de radical libre, durante la reperfusión el ON reacciona con gran avidez con otro radical libre, el superóxido, generando el radical peroxinitrito que puede protonizarse y formar ácido peroxonítrico, que en su forma *trans* es altamente susceptible de ser atacado por metales de transición, generando más radical hidroxilo. Todo esto concluye en un mayor daño de las membranas biológicas y mayor generación de HNE y MDA entre otros, de modo que una generación exagerada de ON puede aumentar la peroxidación de las membranas y la producción de una cantidad mayor de aldehídos derivados de la reacción de terminación en la peroxidación de fosfolípidos de membrana (56).

El daño posterior que se ha llevado a cabo por la implementación de técnicas de revascularización inmediata durante el infarto agudo del miocardio, ha atraído toda la atención hacia el estrés oxidativo. El rápido surgimiento de los ROS después de la reperfusión del miocardio es uno de los más estudiados y mejores descritos modelos de daño tisular debido a estrés oxidativo. La vía de la xantina oxidasa ha sido propuesta también como la mayor contribuyente al daño por reperfusión en la isquemia miocárdica. Como ya se mencionó, la isquemia prolongada produce muchos cambios metabólicos en la célula, incluyendo la disminución de la producción de ATP. La continua necesidad de enlaces fosfatos de alta energía conlleva a un mayor catabolismo de ATP hacia ADP, y finalmente a hipoxantina, que se acumula en el tejido isquémico. Con la reperfusión, el exceso de hipoxantina es convertido a xantina por la xantina oxidasa. Esta reacción genera grandes cantidades de ROS, perpetuando el daño oxidativo y sus consecuencias (34).

1.4. MÉTODOS PARA MEDIR ESTRÉS OXIDATIVO

Muchos enfoques permiten evaluar y demostrar la participación de las ROS en los eventos bioquímicos. De hecho la literatura reporta muchas descripciones de

diferentes metodologías y enfoques para estos propósitos (57- 59). La única técnica para la detección directa de radicales es la resonancia electrónica (60), la cual permite la determinación de radicales relativamente estables. Otra técnica es la del método del atrapador de radicales la cual aplica para radicales más reactivos, como el $\cdot\text{OH}$, que reacciona con una molécula atrapadora para producir un producto radicalario más estable y que puede ser evaluado cómodamente (61). Otro procedimiento permite al radical reaccionar con una molécula detectora para producir otro producto estable que se evalúa usando varias técnicas, tales como hidroxilación del ácido salicílico (62), la prueba de la deoxiribosa (63), la prueba del citocromo c reducido en la detección del radical superóxido (64), y en la detección de radicales del óxido nítrico a través de compuestos coloreados como productos finales (65). Las técnicas para la cuantificación de marcadores de daño oxidativo son a menudo llamados *métodos de huella* por medio de los cuales se cuantifican los productos finales específicos que se generan de la interacción de los ROS con las macromoléculas biológicas, tales como DNA, proteínas, lípidos y aminoácidos de bajo peso molecular. La aparición de estos productos finales se genera como prueba de la previa existencia de ROS, que dejaron su huella impresa en la célula. Sin embargo, también existen muchos otros métodos que avalúan la actividad y composición enzimática, los niveles de sus sustratos, cofactores y productos, así como el nivel de los antioxidantes. Aun así, los diferentes focos de interacción, el DNA, las proteínas y los lípidos son los que merecen mayor importancia (figura 1.4) (33).

1.4.1. DNA y ácidos nucleicos

Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) o cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS) de 8-OHdG después de hidrólisis enzimática del DNA y la evaluación al daño oxidativo de bases a través de electroforesis de una sola célula o la prueba del cometa (66) son dos de las técnicas usadas para

determinar aductos del DNA y modificaciones de bases nitrogenadas. Varios aductos de DNA pueden llegar a ser determinados, como ejemplo tenemos aductos tipo aldehído-DNA, tales como deoxiguanina-malondialdehído (67), o el producto final de la reacción entre DNA y 4-hidroxi-nonal (N²-etenodeoxiguanosina) (33).

1.4.2. Lípidos

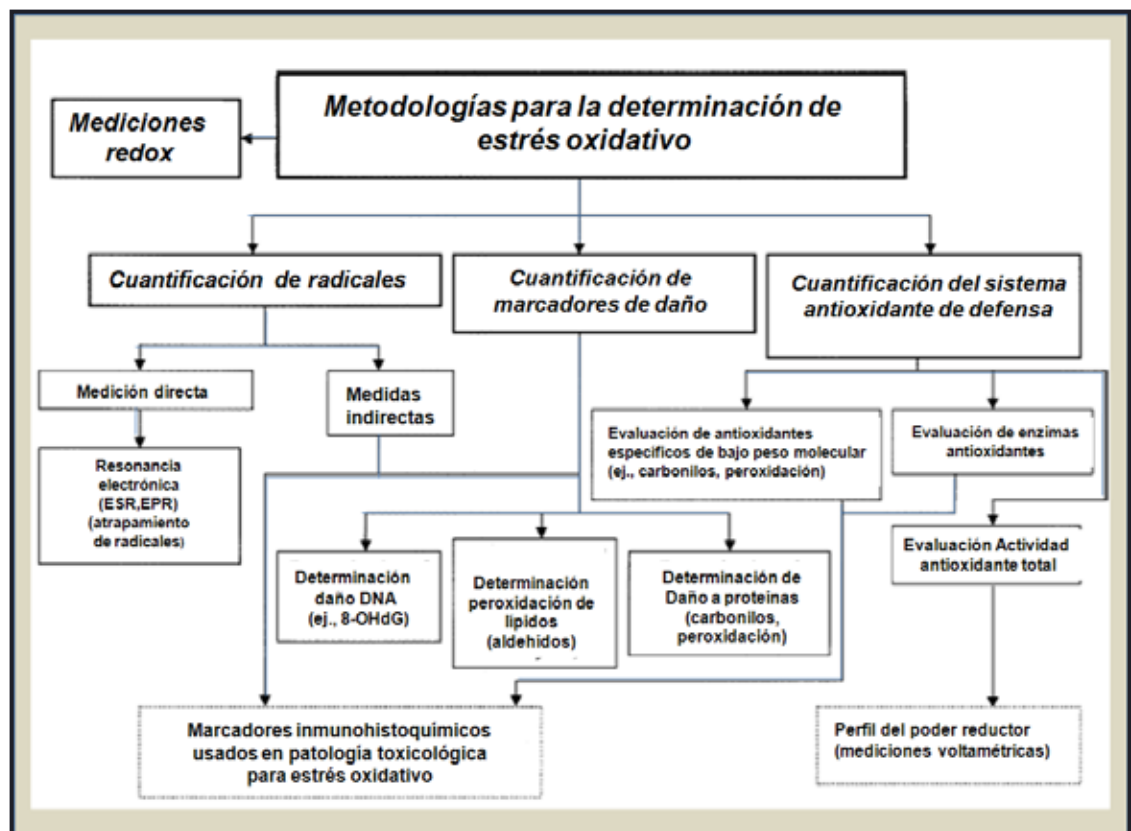
El daño de los lípidos altera y modifica las membranas celulares así como su función. La peroxidación de lípidos es un evento importante en la aterosclerosis, inflamación y funciones mitocondriales, es un proceso complejo que consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación, como se explica más adelante en detalle (9). Para cada etapa hay métodos que cuantifican este proceso así como la evidencia de su ocurrencia (9). De este modo en las etapas iniciales se pueden medir el consumo de ácidos grasos como sustratos de la lipoperoxidación y la formación peróxidos lipídicos de forma específica (HPLC, GC) o de forma más general como sucede con los dienos conjugados a través de métodos espectrofotométricos. En las etapas finales del proceso los productos finales como aldehídos (MDA, 4HNE) de forma específica (HPLC, CG y electroforesis capilar) o de forma más general como con la prueba de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (68).

1.4.3. Proteínas

La evaluación de las proteínas se puede realizar a través de la cuantificación de los carbonilos (69), que son producidos por el ataque de los ROS sobre los residuos de aminoácidos. Incluyendo una estimación general de la cantidad general de carbonilos. Se pueden cuantificar de forma más específica usando técnicas electroforéticas; y por medio de la identificación de: (i) peróxidos, (ii) la

perdida de grupos sulfhidrilos (SH), (iii) la perdida de fluorescencia, (iv) la cloración de proteínas, (v) la nitración de proteínas y (vi) la hidroxilación de aminoácidos.

Figura 1.4. Clasificación de los métodos usados para determinar y cuantificar estrés oxidativo. Adaptado de Kohen (33).



1.5. Peroxidación de lípidos.

La peroxidación de lípidos es la introducción de un grupo funcional que contiene dos átomos de oxígeno concatenados O-O dentro del ácido graso insaturado dentro de la reacción en cadena de los radicales libres. La reacción en cadena comienza con la formación de un radical del carbono central, por la abstracción de

hidrógeno del lípido. Este proceso se puede dividir en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (70).

Iniciación

Diferentes procesos de iniciación (fotólisis y radiación gamma) producen diferentes radicales iniciales. El evento de iniciación tiene un pequeño efecto en la química subsecuente, sin embargo la frecuencia de iniciación controla la extensión de la reacción en cadena (70). (Figura 1.5. Eq. 1.)

Propagación

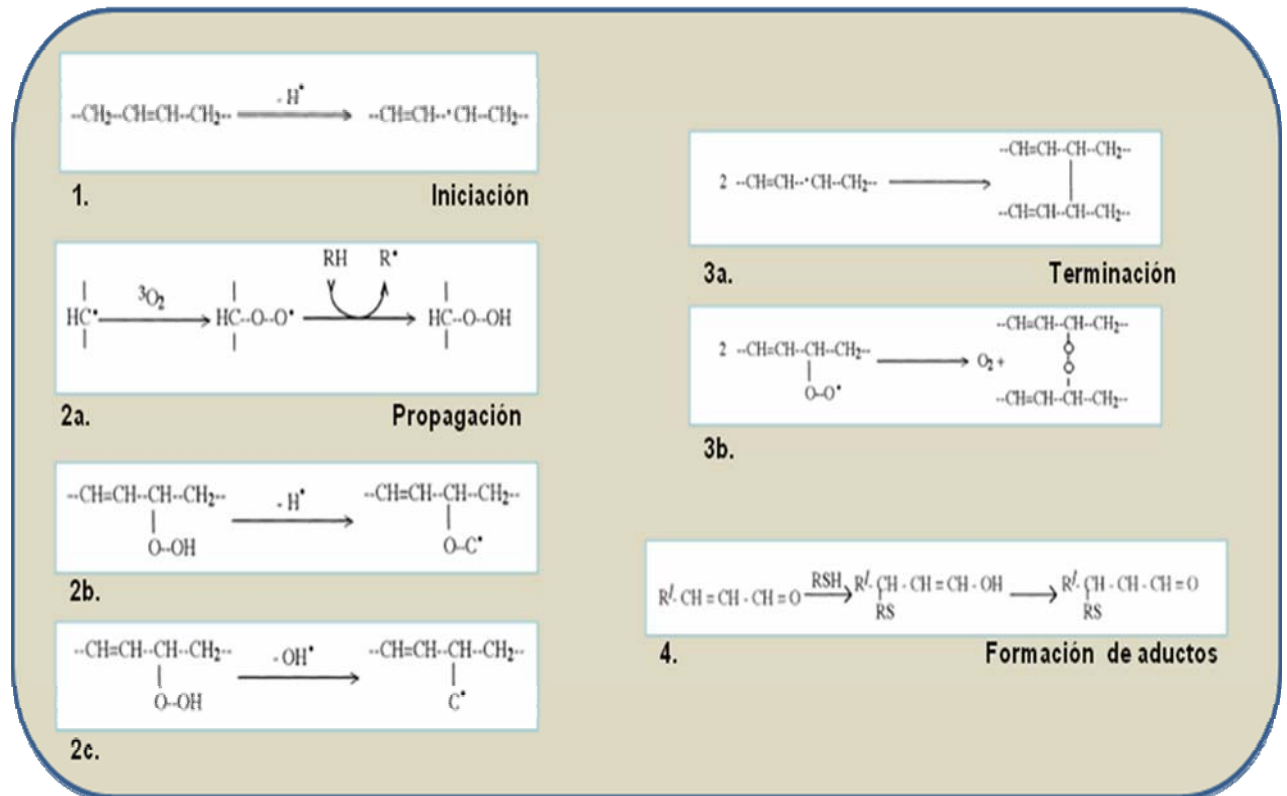
Los radicales producidos en el proceso de iniciación conllevan a reajustes de 1,4-pentadieno a sistemas de 1,3-pentadieno (conjugado) y también reaccionan con tripletas de oxígeno atmosférico para producir radicales de peróxidos lipídicos, los cuales pueden abstraer más hidrógeno y de este modo propagando la reacción en cadena. Las cadenas de polialcalenos con dobles enlaces separados por más de un grupo metileno no se conjugan (70). (Figura 1.5. Eq. 2a.)

Las lipooxigenasas son oxidoreductasas que catalizan la conversión de los PUFAs a sus hidroperóxidos. La peroxidación de enzimas lipídicas, involucran la abstracción de un hidrógeno y la adición de un dióxido en posiciones específicas. La autoxidación no enzimática no es específica de una sola región, la peroxidación ocurre predominantemente en dos posiciones externas que corresponden a los últimos átomos de carbono antes del primer doble enlace del final de cada molécula (70). (Figura 1.5. Eq. 2b. y Eq. 2c)

La ruptura del hidroperóxido a radicales alcoxi (Eq. 2b) y alquil peroxi (Eq. 2c) es catalizada por metales de transición, que son propagadores de la cadena pero

también llevan a la formación de alcoholes secundarios, cetona y aldehídos que incluye (por unión en cadena a cada lado del radical alcoxi) aldehídos de cadena corta. Los productos aldehídicos pueden formar aductos con proteínas en niveles de nmol/mg. Estos pueden surgir bien sea de la oxidación de radicales libres de la proteína o por una adición de Michael de (a) grupos *tiol* en la proteína hacia los alqui-2-enaes (ver figura 1.5. Eq. 4) como por ejemplo el HNE. Los grupos *tiol* siendo nucleófilos suaves y por lo tanto forman fácilmente enlaces covalentes a átomos de carbono, atacan los dobles enlaces alqueínicos y el *enol* resultante, rápidamente tautomeriza al aldehído correspondiente (70).

Figura 1.5. Ilustración que muestra las ecuaciones que describen las etapas del proceso de lipoperoxidación lipídica. 1. Iniciación, 2. Propagación, 3. Terminación y 4. Formación de aductos. Tomado de Wheatley R.A. (70).



La figura 1.6 muestra como el malondialdehído es producido por la peroxidación de ácido trianoico. Las concentraciones de los productos de la reacción en cadena son índices útiles del deterioro oxidativo. Esta reacción causa la inhibición enzimática responsable de la citotoxicidad generada por los aldehídos insaturados. Los productos de la peroxidación son rápidamente metabolizados, y el rango que afecta la concentración estable se estima que sea de 2 a 5 mM del total de los compuestos carbonilos citoplasmáticos. Esta concentración es lo suficientemente alta para inhibir enzimas, pero sus concentraciones en la

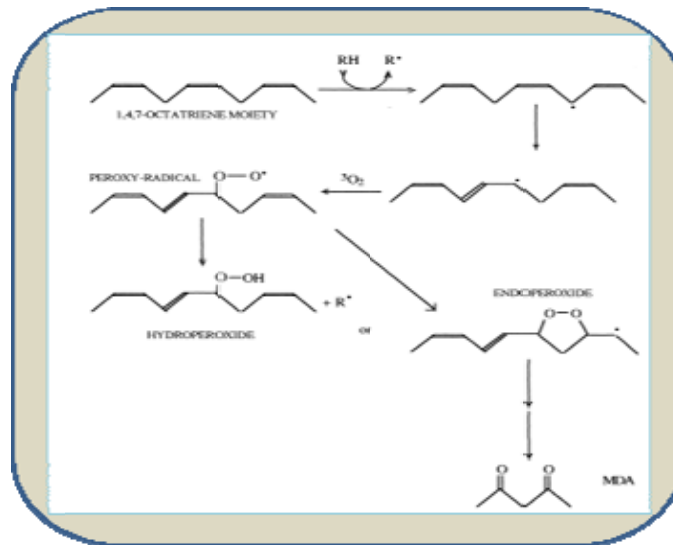
membrana son mucho más altas debido a la lipofilicidad de estos productos. Los aldehídos (ej. MDA y HNE) pueden también formar aductos con el ADN (8).

Terminación

La reacción en cadena se termina con reacciones entre los radicales produciendo dímeros y altos polímeros. Como se muestra en la figura 1.5 (Eq. 3a y 3b), el proceso de la peroxidación lipídica causa el movimiento de los dobles enlaces en las moléculas del ácido graso; luego los dienos de metileno interrumpido se conjugan.

La peroxidación lipídica es también un fenómeno patológico de una gran cantidad de consecuencias y como tal es frecuentemente investigada en la biomedicina. En ésta área los ensayos para las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBRS) son mucho más usadas que cualquier otro índice de peroxidación lipídica (70).

Figura 1.6. Ruta de la peroxidación de lípidos, se toma como ejemplo el malondialdehído (MDA) que es formado de una fracción del 1, 4, 7-octatrieno.



1.5.1. 4-Hidroxinonenal

Pertenece al grupo de los 4-hidroxiálkenales que fueron descubiertos en los años sesentas en estudios que evalúan la caracterización de las sustancias citotóxicas y carcinostáticas presentes en el metil-linoleato autooxidado. El HNE fue identificado como una de las mayores sustancias tóxicas en la fracción de bajo peso molecular del metil-linoleato. También se forma entre muchos otros aldehídos como pentanal, hexanal, 2-hexenal, 2-heptenal, 2-octenal, 2-nonenal, 2-4-nonalienal, 2-4-decadienal, ácido 9-oxononanoico, donde el HNE y el 2,4-alcalienal fueron identificados como los aldehídos de mayor toxicidad usando cultivo de fibroblastos (8). Muchos de los estudios sobre los 4-hidroxiálquenales se realizaron durante el final de la década de los setentas, resaltando su actividad

carcinostática, su potencial uso como tratamiento tumoral, y su reactividad sobre compuestos *tiólicos* de importancia biológica (glutatión, cisteína, SH-proteínas) (8). El mecanismo de formación de los hidroxialquenales es complejo y no ha sido comprobado en los sistemas biológicos, los datos actuales se han obtenido experimentalmente. Sin embargo, en general se puede concluir que el HNE puede ser formado a partir de los ácidos grasos poliinsaturados omega 6 como el ácido linoléico, ácido araquidónico, y ácido gamma-linoléico, y también puede formarse de los PUFAs omega 3 como el 22:6. La determinación de HNE se ha realizado a través de métodos que usan CG y HPLC acoplado a espectrometría de masas. El método por HPLC es considerado como el más apropiado (8).

Los efectos biológicos generales de los hidroxialquenales fueron estudiados con la intención de aclarar si pueden mediar efectos en las células y tejidos en respuesta al estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos. La mayoría de efectos reportados fueron divididos en tres categorías dependiendo de la concentración de los aldehídos en el sitio de acción:

- a. Valores mayores o iguales a 100 μM : HNE producen efectos citotóxicos agudos y más o menos inespecíficos, causando en muchos casos muerte celular rápidamente; muchas de las funciones celulares básicas catabólicas (ej. Respiración mitocondrial) y anabólicas (DNA, RNA, y síntesis de proteínas) son parcial o totalmente inhibidas por dichas altas concentraciones.
- b. Concentraciones de HNE en el rango de 1 a 20 μM : pueden inhibir la replicación del DNA y la síntesis de proteínas, estimular la fosfolipasa A_2 e inhibir la expresión del proto-oncogen *c-myc*. Muchos estudios parecen mostrar que el HNE puede existir en tales concentraciones, sugiriendo que algunos de estos efectos pueden de hecho ser producidos tisularmente en respuesta al estrés oxidativo.

- c. Concentraciones por debajo de 0.1 μM pueden tomarse como niveles fisiológicos en muchos tejidos así como también en suero, y los efectos observados en este rango de concentración son atribuidos a efectos fisiológicos tales como la quimiotaxis, la modulación de la actividad de la adenilato ciclasa, débil estímulo de la actividad de la guanilato ciclasa, y la estimulación de la fosfolipasa C. Para el HNE la dosis efectiva para realizar este efecto es muy bajo en un rango entre 10^{-6} y 10^{-9} M (8).

Las concentraciones basales del HNE detectables en suero humano bajo condiciones basales parecen estar entre 0.05 - 0.15 μM , con un máximo observado de 0.5 μM . Estos valores fueron medidos con los métodos del 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) y de la oxima O-pentafluorobencilo, respectivamente (71, 72). Strohmaier *et al*, estudiaron más recientemente las concentraciones fisiológicas de HNE en 10 adultos voluntarios, fue obtenido un valor estándar de $0,65 \pm 0,39 \mu\text{M}$, siendo en promedio mayor en hombres que en mujeres (0.78 ± 0.43 vs. $0.45 \pm 0.23 \mu\text{M}$) (73). Los valores fisiológicos en plasma de HNE aumentan con la edad, relacionado con la tendencia al deterioro del balance oxidativo en el envejecimiento (74).

1.5.2. Rol fisiopatológico del HNE

La evidencia del aumento del HNE en los tejidos y la sangre en diferentes estados patológicos humanos, sugieren su participación en la expresión clínica y posible progreso de las enfermedades. A pesar del papel primario o secundario que juegan los productos finales de la peroxidación lipídica en una patología específica, es claro el hecho de que el HNE puede hacer parte de la señalización celular relacionada con las reacciones inflamatorias, tomando en cuenta que la inflamación es uno de los eventos centrales en la progresión y fisiopatología de muchas enfermedades crónicas (74).

El primer punto clave, aún bastante discutido por sus implicaciones patológicas es el estrés oxidativo o mejor dicho, daño oxidativo tras la oxidación de las biomembranas lipídicas (peroxidación lipídica), una de las mayores consecuencias en el desequilibrio redox tras la oxidación tisular y celular. De hecho, el estrés oxidativo es una característica bioquímica común para 39 tipos diferentes de patologías entre las que se encuentran el accidente cerebro vascular, la aterosclerosis, la diabetes mellitus, cardiomiopatía dilatada y el infarto agudo de miocardio en su fase inicial y progreso (74, 75). Otro punto clave más importante aún es la inflamación, especialmente aquella inflamación relacionada con fibrosis, una característica típica de las enfermedades HNE positivas, especialmente durante la fase de progresión. La evidencia muestra que el HNE es una molécula que participa en la señalización celular involucrada en la respuesta inflamatoria, esto debería representar una prueba sólida de la relación del HNE con la patología humana (8), y por lo tanto de una posible utilidad en el IAM.

En cuanto a la enfermedad coronaria y estrés oxidativo, se han obtenido concentraciones de proteínas modificadas en tejido endomiocárdico de pacientes con cardiomiopatía dilatada, proporcionales a la dilatación ventricular y la disfunción sistólica (37, 13). El aumento en los niveles de aductos proteicos de HNE han sido detectados en plasma de pacientes con infarto agudo del miocardio que son llevados a angioplastia coronaria, este hallazgo muestra asociación entre el estrés oxidativo y el infarto agudo del miocardio (76).

1.5.3. 4-HNE y NT-proBNP

La síntesis de NT-proBNP es estimulada por estrés del miosito (37), ya sea por aumento del estiramiento miocárdico secundario a la disfunción ventricular izquierda y/o derecha a causa de la hipoxia celular, la isquemia, la frecuencia cardíaca, y una variedad de citoquinas proinflamatorias y neurohormonas con

efectos vasoconstrictores, antidiuréticos, hipertróficos y citoproliferativos (45). Del mismo modo, los productos finales de la peroxidación de lípidos de membrana como el HNE ha mostrado participar en vías de señalización inflamatoria (8), lo que es fácil de asociar si tomamos en cuenta que la inflamación es parte de la respuesta fisiopatológica en el infarto agudo de miocardio. También se ha encontrado relación entre los marcadores inflamatorios y la producción de NT-proBNP en la fase aguda del infarto al miocardio, ambos factores relacionados con la extensión del infarto y con el pronóstico durante su estancia en la unidad de cuidados intensivos, así como también en su seguimiento a largo plazo (48). Además, se han hallado asociaciones consistentes entre el estrés oxidativo y las enfermedades de origen cardiovascular (37, 76); así como específicamente en el IAM (77, 52). En este sentido otros oxidantes reactivos, como la mieloperoxidasa y los compuestos carbonílicos derivados de la oxidación de las proteínas, relacionados con el estrés oxidativo, muestran elevación después del IAM e incluso funcionan como factores de riesgo en la mortalidad a largo plazo, añadiendo valor pronóstico a la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y los niveles plasmáticos de NT-proBNP (12). Ha sido a través de estos hallazgos que se han propuesto las nuevas estrategias de multimarcadores, que han resultado útiles en la estratificación del riesgo entre pacientes con síndromes coronarios agudos sin elevación del ST como grupo de importancia en cuanto al desafío diagnóstico (13). De este modo valdría la pena ensayar nuevos marcadores no invasivos de estrés oxidativo de interés fisiopatológico con marcadores de estrés del cardiomiocito con alto valor pronóstico ya establecido (NT-proBNP) y evaluar la utilidad de su asociación en el infarto agudo del miocardio sin elevación del ST como grupo ubicado en una zona intermedia de riesgo entre un daño miocárdico grave evidente y eventos coronarios isquémicos de menor gravedad caracterizados por ausencia de daño tisular.

El valor pronóstico del péptido natriurético en la evolución a corto plazo de los SCA se ha demostrado en distintos estudios clínicos (5, 6, 43, 48, 45). Sin embargo, no existen hasta la fecha estudios que evalúen su relación con productos de peroxidación lipídica como el HNE en la fase aguda del IAM, y mucho menos a través de técnicas de HPLC que optimizan la sensibilidad y el nivel de detección del analito (8, 74), contribuyendo así a esclarecer su posible papel como biomarcador.

Métodos para determinación. HNE

Los métodos comúnmente usados para la determinación de aldehídos en muestras biológicas son basados en el tratamiento de la muestra con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Los aldehídos reaccionan con la DNPH para formar los correspondientes derivados dinitrofenilhidrazonas. A diferencia de la mayoría de los aldehídos libres, las hidrazonas derivatizadas son compuestos estables y no volátiles, que ofrecen gran facilidad en la manipulación en los procedimientos de laboratorio. Este método es de elección cuando se cuenta con bajas concentraciones de HNE en la muestra ($\leq 1 \mu\text{M}$), ofreciendo entre otras una ventaja sobre los métodos de determinación directa de HNE por HPLC (58)

La investigación en cuanto a la determinación de aldehídos por el método de la derivatización con DNPH ha establecido esquemas que muestran claramente la distribución esperada de dichos aldehídos sobre la placa de TLC (83), como el que muestra la figura 2.2. Dado que existen aldehídos contaminantes normalmente presentes en el ambiente del laboratorio y en los materiales usados durante la síntesis, tales como formaldehído, osazonas y algunas cetonas entre otros, se encuentran compuestos derivados de la DNPH que requieren ser removidos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Existirá diferencia en los niveles plasmáticos del 4-hidroxi-2-nonenal asociados con los niveles de NT-proBNP en sujetos con IAM sin elevación del ST en su fase aguda comparados con los de sus controles sanos?

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la concentración plasmática del 4-hidroxi-2-nonenal como indicador bioquímico de daño oxidativo en pacientes con infarto agudo del miocardio sin elevación del ST y analizar su relación con la producción del extremo amino terminal de la prohormona del péptido natriurético cerebral.

Objetivos específicos

1. Comparar los niveles de HNE y NT-proBNP entre los pacientes con diagnóstico de infarto agudo del miocardio y sus controles sanos.
2. Evaluar la correlación entre los niveles de aldehído y los de NT-proBNP.
3. Revisar la relación entre la severidad del infarto agudo del miocardio y los niveles de HNE
4. Determinar las características del HNE como posible biomarcador en el infarto agudo del miocardio sin elevación del ST.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. SELECCIÓN DE LOS PACIENTES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

2.1.1. Grupo de estudio

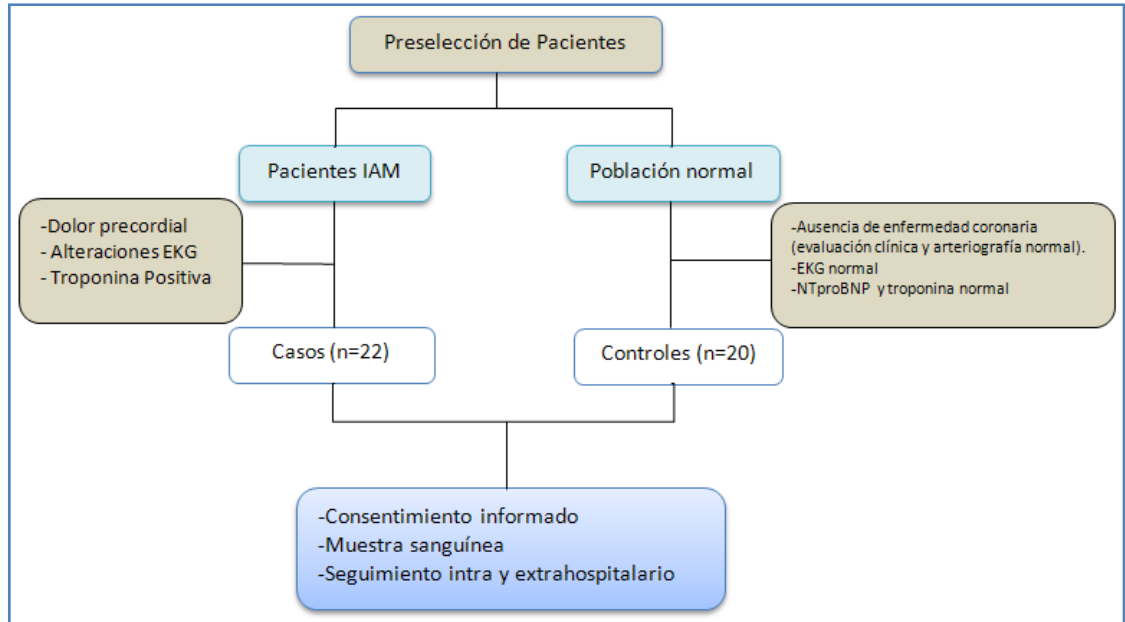
La inclusión de los participantes en este estudio se anidó en el proyecto “IDENTIFICACION DE MARCADORES DERIVADOS DEL PEPTIDO NATRIURETICO PRO B COMO PREDICTORES DE MORTALIDAD EN PACIENTES CON SINDROME CORONARIO AGUDO”, financiado por COLCIENCIAS en el año 2007 con código No. 1102-408-2043-2008. El grupo de pacientes tenían diagnóstico electrocardiográfico inicial de Infarto agudo del miocardio sin elevación del segmento ST (NSTEMI). Fueron atendidos en el servicio de urgencias dentro de las primeras 48 horas después del inicio de los síntomas. Este proceso fue llevado a cabo por los cardiólogos del servicio de urgencias del Hospital Universitario de Santander (HUS), el Instituto del Corazón (IC) y la Fundación Cardiovascular de Colombia (FCV). De otro lado, contamos con 20 personas aparentemente sanas sin evidencia de enfermedad coronaria aguda que sirvieron de controles negativos.

Los pacientes fueron incluidos si cumplían con los criterios de dolor precordial asociado a anormalidades electrocardiográficas. En la evaluación clínica inicial se aplicaron los siguientes criterios de inclusión: pacientes con síntomas de dolor precordial, electrocardiograma sin elevación del segmento ST y niveles de troponina T en plasma ≥ 0.04 ng/mL. Criterios de exclusión: (i) tiempo mayor de 48 horas de inicio de los síntomas, (ii) antecedentes de cáncer e IRC en estadio ≥ 3 , (iii) diagnóstico de angina de pecho. Se obtuvo de cada uno su consentimiento informado y se registraron datos clínicos que incluyeron: estado al ingreso, antecedentes patológicos, escala de riesgo TIMI, resultados de los exámenes

paraclínicos, hallazgos electrocardiográficos y aparición de complicaciones. Fueron extraídos 6 mL de sangre venosa en tubos con heparina de litio y 4 mL en tubos con citrato de sodio, luego repartidas y almacenadas a -20 °C.

Los controles sanos se tomaron de la comunidad y no de la población hospitalaria porque los centros clínicos donde se incluyeron los pacientes son especializados en patología cardíaca. Se visitó el barrio Bucaramanga donde se llevaba un trabajo de salud pública y se incluyeron los controles sanos con los siguientes criterios: sin anomalías electrocardiográficas, niveles de troponina T negativa, hallazgos y antecedentes clínicos que descartaron enfermedad coronaria aguda. Se incluyeron pacientes con comorbilidad y factores de riesgo conocidos como HTA, diabetes mellitus, tabaquismo y dislipidemia entre otros, de tal forma que las características de ambos grupos fueran lo más homogéneos posible y dejando que el daño isquémico agudo del tejido miocárdico como fuera la principal diferencia. Cada persona en este grupo firmó un consentimiento informado y le fue extraída una muestra sanguínea bajo las mismas condiciones del grupo de pacientes con NSTEMI. Su registro del trazo electrocardiográfico fue interpretado por médicos expertos de la FCV y la UIS. El estudio contó con la aprobación de los comités de ética del Hospital Universitario de Santander, La Fundación Cardiovascular y el Instituto del Corazón y el ISABU. La figura 2.1 muestra el flujograma que explica el proceso de selección y seguimiento de los pacientes a lo largo del estudio.

Figura 2.1. Flujo de selección, estudio y seguimiento de los participantes (casos y controles) en el estudio.



2.1.2. Muestras Biológicas

Se extrajeron 4 mL de sangre fresca mezclados con 0.3 mL de solución de citrato de sodio isotónico (18 mM) como anticoagulante e inmediatamente fue refrigerado. Inmediatamente, el plasma se obtuvo por centrifugación a 3500 x g durante 10 min. El plasma preparado fue refrigerado y transportado en hielo seco hacia el Laboratorio Clínico CAPRUIS. Se mantuvo la cadena de frío de tal manera que se generara una mínima reactividad molecular y conservar intactos los niveles de HNE de la muestra. La muestras fueron almacenadas a -20 °C en un tiempo no mayor a tres meses; después de este tiempo las muestras se almacenaron a una temperatura de -70 °C.

2.1.3. Consideraciones éticas

De acuerdo con el artículo 11 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, la presente investigación se encontró clasificada como de *no riesgo*, ya que no hace intervenciones a pacientes. La información de los pacientes, los plasmas y el consentimiento informado fueron obtenidos en concordancia con lo aprobado para el proyecto que anida a este mismo titulado “IDENTIFICACION DE MARCADORES DERIVADOS DEL PEPTIDO NATRIURETICO PRO B COMO PREDICTORES DE MORTALIDAD EN PACIENTES SINDROME CORONARIO AGUDO”, del cual este proyecto realizó el reclutamiento de los casos y los controles, tal como se describió en párrafos anteriores.

De acuerdo al párrafo numero 3 de la hoja numero 2 del consentimiento informado del estudio que anida esta investigación, que menciona “se le informará al paciente telefónicamente en caso que necesite realizar algún estudio adicional”, de este modo y dado el caso, se realizó el análisis de las muestras tras solicitar aprobación telefónica al paciente para la realización de los exámenes adicionales a cargo del mismo estudio.

2.2. MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.2.1. Preparación del derivado estándar 2,4-dinitrofenilhidrazona.

Derivatización con DNPH:

La reacción entre la molécula de DNPH y HNE sigue teóricamente un rendimiento cuantitativo del 100%, de modo que para 3 mg de HNE que se usaron se esperaba obtener 5.45 mg del compuesto derivado. La síntesis de la solución patrón del derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona (HNE-DNPH) siguió los

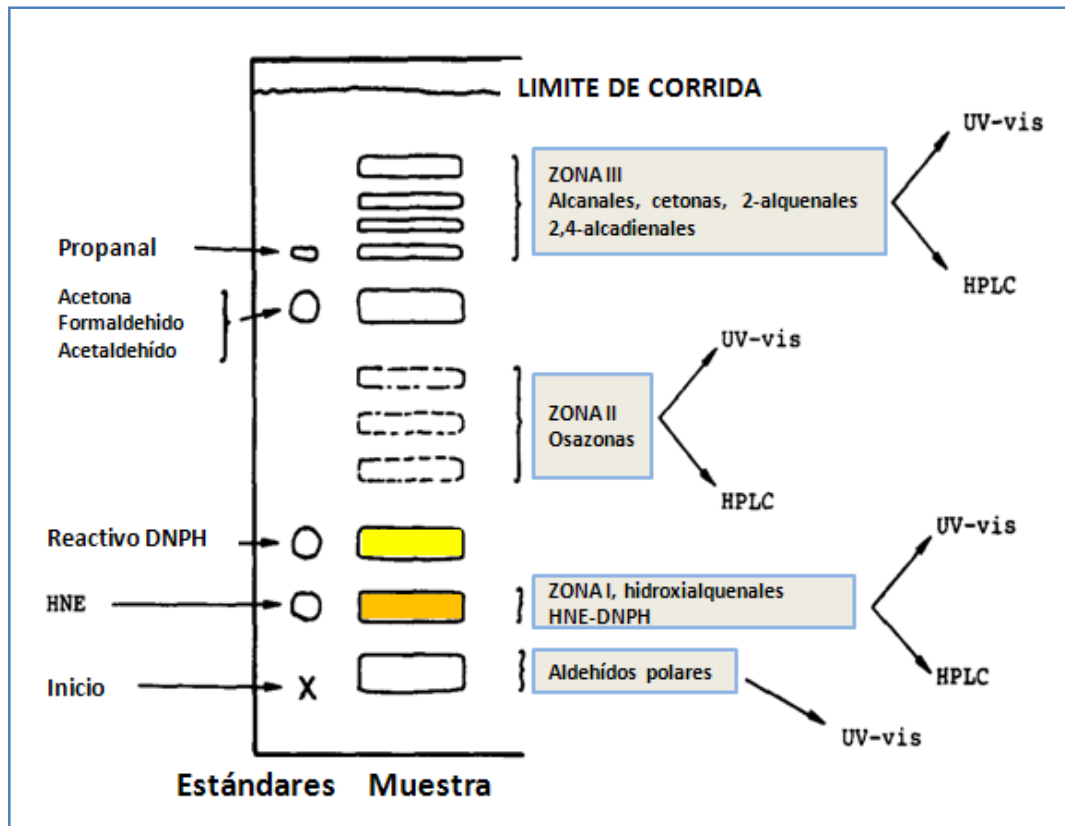
procedimientos generales de Pompella y cols. (82). Se mezclaron 400 μ L de una solución acuosa de HNE a una concentración de 8.17 μ M con volumen igual de una solución de DNPH (2g diluidos en 5 mL de ácido sulfúrico al 98% y etanol 50% concentración final). Esta reacción química se llevó a cabo mediante incubación a temperatura ambiente, en la oscuridad, bajo agitación durante 30 min y a pH 3.0. El derivado HNE-DNPH sintetizado fue extraído dos veces con 800 μ L de diclorometano, mediante agitación (1 min.) y centrifugación (4500 x *g*, 4°C, 10 min.). Una vez retirado el sobrenadante acuoso fue llevado a sequedad con nitrógeno. Las cantidades de agua que no pudieron ser retiradas macroscópicamente se removieron agregando sulfato de magnesio anhídrido y lavando sucesivamente con 200 μ L de diclorometano, llevado a sequedad nuevamente para luego resuspender en 100 μ L de metanol. Finalmente la muestra fue sometida a purificación por medio de cromatografía de capa fina (TLC). Los derivados de la DNPH fueron reconocidos fácilmente por su intensa coloración amarillenta, la abundancia y sus patrones de migración característicos.

Separación por cromatografía de capa fina (TLC) y purificación:

Los derivados de DNPH extraídos fueron colocados a lo largo de la base de una placa de TLC (20 cm x 20 cm x 0.2 mm, recubierta de sílica gel obtenida de Laboratorios Merck) en una banda de aproximadamente 3 – 5 cm de largo, y se corrió dos veces con diclorometano los primeros 5 cm y con benceno los siguientes 13 cm. El estándar de DNPH fue corrido en paralelo. El área correspondiente al estándar HNE-DNPH correspondiente a las hidrazonas de la zona I (figura 2.2), que estuvieron a un factor de retención (R_f) por debajo de la DNPH que no reaccionó y que se identificó como una gran banda amarilla intensa de aproximadamente 1.5 cm de grosor, que fue arrancada ($R_f = 0.5$) luego eluída y centrifugada en tres ocasiones con 2 mL de metanol. El extracto metanólico fue

llevado a sequedad con nitrógeno y redisolto en 200 μ L de metanol antes del análisis por HPLC (83).

Figura 2.2. Esquema que muestra la determinación por separación de los derivados de la DNPH usando TLC. El derivado estándar HNE-DNPH sintetizado de fue recuperado de la zona I a 5-6 cm del inicio aproximadamente ($R_f=0.5$).



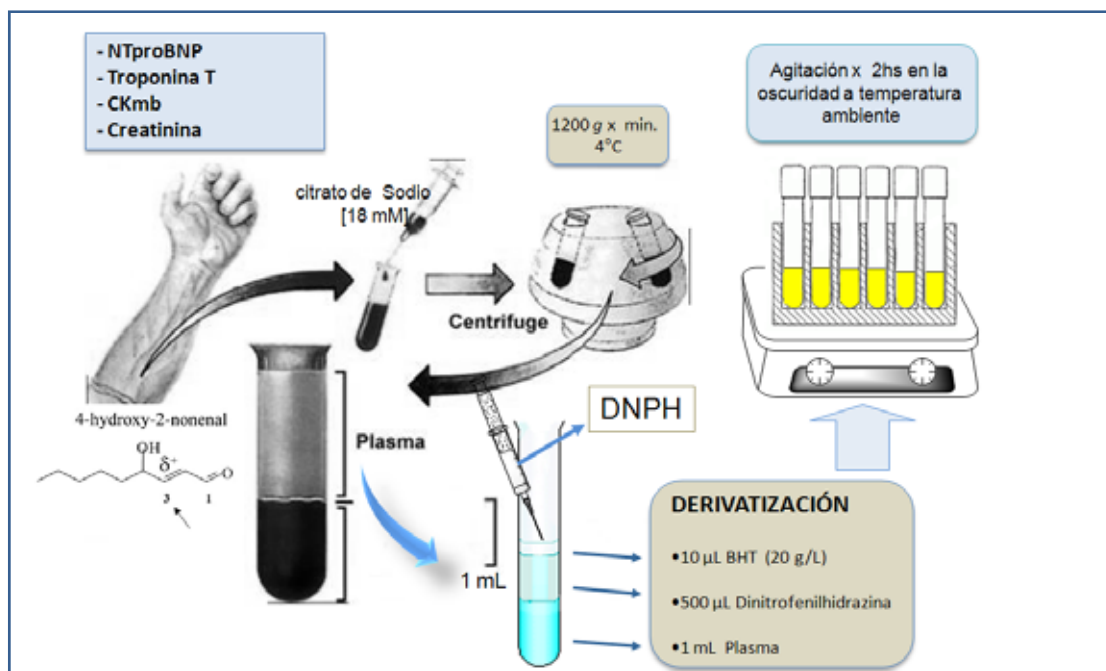
La concentración de la solución estándar del HNE-DNPH en metanol; fue determinada espectrofotométricamente a 370 nm basados en la absorbitividad molar $\epsilon = 28000$, por medio de la ley de Lambert-Beer, realizamos 7 diluciones distintas (1:150 - 1:450) a través de las cuales calculamos su concentración y a

través de la absorbancia promedio se calculó que a través de la reacción se obtuvieron 0.56 g/mL, luego la solución fue llevada a 500 μ L de volumen final y se obtuvo una concentración de 3.05 M (1.027 g/mL) (75). Con esta solución patrón se realizó la curva de calibración por HPLC. De este modo el porcentaje de recuperación fue del 19% a partir del cálculo de rendimiento cuantitativo inicial.

2.2.2. Preparación de la muestra para medición de 4HNE

El plasma fue repartido en alícuotas de 1 mL, a cada uno de los cuales se le adicionaron 10 μ L de solución metanólica de BHT al 2% para prevenir la oxidación durante el transporte, manipulación y almacenamiento evitando así la degradación y/o la formación de *novo* del 4HNE por autooxidación (83). En un tiempo no mayor a 30 minutos a partir del momento en que se tomó la muestra, fueron añadidos 500 μ L de una solución acuosa de DNPH (50 mL de HCL 1N mezclados con 25 mg de DNPH) para la derivatización y la mezcla de la reacción se sometió bajo agitación constante en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas (84). La figura 2.3 ilustra los procedimientos generales que se siguieron desde la extracción manual de la muestra hasta su derivatización con DNPH.

Figura 2.3. Representación del proceso de extracción, manejo y procesamiento de las muestras sanguíneas hasta la derivatización con DNPH.



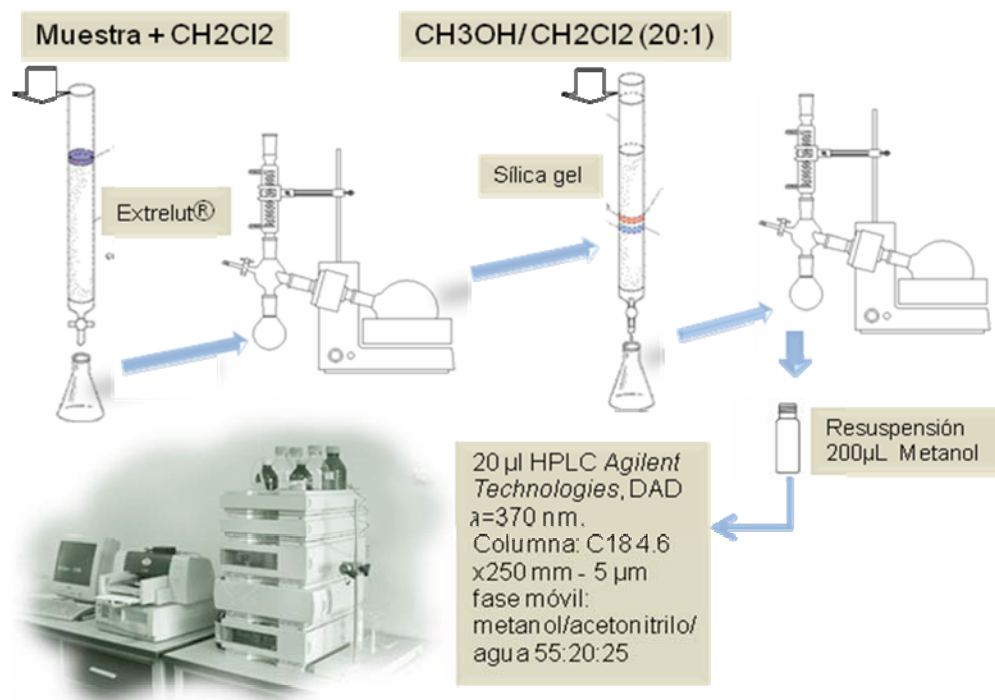
Preparación de las muestras para cromatografía de absorción

Posterior a la derivatización, la muestra fue diluida con 500 μL de agua destilada para mejorar su fluidez y luego vertida en una columna empacada con 1,6 g de material de extracción Extrelut®, una vez distribuido a lo largo de dicha columna se agregaron 40 mL de diclorometano y luego se recolectó el volumen del eluyente coloreado amarillento que contiene las hidrazonas lipofílicas (25 – 30 mL). El volumen fue llevado a sequedad mediante rotovaporación bajo presión reducida, a una temperatura $\leq 35^\circ\text{C}$ y finalmente redisoluto en 1,4 mL de diclorometano (72).

Cromatografía de absorción

Luego la muestra fue llevada a cromatografía de absorción donde se removieron la mayoría de las hidrazonas y otros compuestos carbonílicos no polares, reactivos sin reaccionar y carbonilos polares de los 4-hidroxiálquenos, que de otro modo podrían interferir en el análisis por HPLC posterior (84). La muestra disuelta en diclorometano se vertió de manera homogénea en la parte superior y sobre un papel filtro de una columna de adsorción rellena con 15 g de sílica gel 60. Una vez evaporado todo el diclorometano se utilizó una solución de diclorometano/metanol 20:1 como eluyente. Posteriormente se recolectó la fracción presente entre los primeros 30 mL. Finalmente, la fracción recolectada fue nuevamente llevada a sequedad por rotavaporación y luego redisuelta en 200 μ L de metanol grado HPLC y refrigerado a -20°C hasta el momento del análisis. La figura 2.4 esquematiza el proceso de extracción y purificación del derivado HNE-DNPH de la muestra de plasma derivatizada.

Figura 2.4. Representación de la preparación de la muestra por cromatografía de columna hasta su identificación y cuantificación de HNE-DNPH por HPLC, realizados por comparación de los tiempos de retención y la altura del pico de los cromatogramas de la muestra, con los de las soluciones estándar del conjugado.



2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.3.1. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La separación del derivado HNE-DNPH fue realizado usando Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa (RP-HPLC). Para esta técnica se realizó la cuantificación a través de una curva de calibración (11). Ver anexo A.1.

Una alícuota de 20 μL de la solución metanólica de la muestra fue inyectada usando un equipo *Agilent Technologies* acoplado a control de temperatura establecida en 25 °C, inyector automático y un detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda 370 nm, en el que el compuesto mostró una fuerte absorción máxima. Se usó una columna *Hewlett Packard C18*, 4.6 x 250 mm - 5 μm de diámetro de poro, protegido por una precolumna *Agilent Technologies Eclipse XDB-C18 4-Pack (Analytical guard column 4.6 x 12.5 mm - 5 μm)*. Se utilizó como fase móvil metanol/acetonitrilo/agua a una relación 55:20:25, respectivamente. La identificación y la cuantificación se realizaron por comparación de los tiempos de retención y la altura del pico de los cromatogramas de la muestra, con los cromatogramas del estándar conjugado HNE-DNPH a concentraciones conocidas. La autenticidad de los picos fue verificada usando el derivado sintético HNE-DNPH como estándar interno. El flujo de la fase móvil fue ajustado a 1 mL/min para obtener tiempos de retención de aproximadamente de 16 a 17 min y la línea base se estableció a 0,01 miliunidades de absorbancia a full escala (mAU) (85).

2.3.2. Análisis confirmación HNE-DNPH (HPLC/MS)

Análisis inicial fue realizado por cromatografía líquida en fase reversa, se recogieron fracciones correspondientes a los picos encontrados en la solución patrón, y los picos de las muestras de los pacientes. La identidad de HNE-DNPH se confirmó por medio de espectrometría de masas. El equipo utilizado fue un espectrómetro de masas, marca Bruker, modelo Amazon X, equipado con una fuente de ionización por electrospray y un analizador de trampa iónica. Se obtuvieron espectros de masas en polaridades de ionización positiva y negativa, empleando un flujo de la muestra de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ y un tiempo de acumulación de los iones de 1000000 μs .

2.3.3. Análisis de NTproBNP por quimioluminiscencia.

La cuantificación del NTproBNP se realizó en el Laboratorio Clínico CAPRUIS. La cuantificación del NTproBNP procesada a través del kit diagnóstico IMMULITE® 2000 para NTproBNP (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA), que utiliza quimioluminiscencia de dos sitios en fase sólida, que consiste en una prueba inmunométrica con un ciclo de incubación de 1×30 min en un dispositivo analizador IMMULITE 2000, usando los mismos anticuerpos monoclonales del Elecsys proBNP kit de Roche Diagnostics (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Del cual se ha estudiado la estabilidad y la precisión en la medición de los niveles de la pro-hormona con fines diagnósticos (86).

2.3.4. Biometría sanguínea.

La biometría sérica complementaria fue realizada por el laboratorio clínico del Hospital Universitario de Santander y en algunos casos por los laboratorios locales de los centros hospitalarios anexos, como la Clínica Chicamocha a través del Instituto del Corazón y la Fundación Cardiovascular de Colombia. La metodología usada varió para cada prueba, los niveles de troponina T sanguínea y CKMB se cuantificaron por electroquimioluminiscencia en un analizador Elecsys 2010 y la actividad de CK-MB en un analizador Integra 700 (Roche Diagnostic S.L.). La creatinina sérica por medio de una reacción colorimétrica en el espectro de absorción azul-verde (490 – 500nm) detectando la formación del complejo color amarillento de creatinina – picrato.

Cálculo del tamaño del infarto y la fracción de eyección.

Para determinar el tamaño del área del músculo cardíaco infartado, se han utilizado métodos de tipo enzimático (87), angiográficos, así como estudios que

emplean isótopos radiactivos o la resonancia magnética nuclear. Estos estudios resultan muy costosos. Con el mismo objetivo se ha usado la electrocardiografía. Selvester y Cols.,(88) crearon un sistema para la estimación del tamaño del IAM basado en la medición y relación de ondas del electrocardiograma (ECG) de doce derivaciones (89, 91). Con la intención de mejorar su empleo práctico Wagner y cols., simplificaron el sistema de Selvester (90). Estos autores informaron haber obtenido con esa modificación una especificidad de 98%.

De este modo aprovechando los trazos electrocardiográficos se calculó el tamaño del infarto y la fracción de eyección (FE). Para esto se utilizó el método electrocardiográfico de Selvester modificado por Wagner, la puntuación se expresó en números enteros. Cada puntuación analizada se multiplicó por 3, el resultado se expresó en términos del porcentaje de masa la muscular comprometida (90) y se evaluó la asociación de la puntuación con el área infartada, de modo que se consideró de la siguiente forma: (i) ≤ 5 puntos correspondió a un compromiso $\leq 15\%$, (ii) de 6 a 8 puntos a un compromiso del 18 al 24 %, y (iii) 9 o más puntos correspondió a un daño $\geq 27\%$. El sistema de puntuación usado es mostrado en el cuadro 2.1.

La FE fue calculada con la fórmula $FE \% = 60 - (3 \times QRS_{longitud})$. Con una sensibilidad descrita de 0.93 y especificidad de 0.88 y una correlación de ECG con ventriculografía con radioisótopos a través de regresión con $r_2 \sim 0.69 - 0.95$ con una media de 0.84 tomando en cuenta los tiempos de evaluación de 3,8 semanas y a un año y por supuesto la localización del infarto (89).

Cuadro 2.1. Criterios para determinar del sistema de puntuación de escala del QRS según Selvester/Wagner (90).

Derivación	Duración (mseg)	Criterios amplitud de proporciones		Puntos máximos	
I	$Q \geq 30$	(1)	$R/Q < 1$	(1)	2
II	$Q \geq 40$	(2)			2
	$Q \geq 30$	(1)			
aV _L	$Q \geq 30$	(1)	$R/Q < 1$	(1)	2
	$Q \geq 50$	(3)	$R/Q < 1$	(2)	
aV _F	$Q \geq 40$	(2)			5
	$Q \geq 30$	(1)	$R/Q < 2$	(1)	
V ₁	Alguna Q	(1)			4
	$R \geq 50$	(2)			
	$R \geq 40$	(1)	$R/S < 1$	(1)	
V ₂	Alguna Q o $R \geq 1$	(1)			4
	$R \geq 60$	(2)			
	$R \geq 50$	(1)	$R/S < 1.5$	(1)	
V ₃	Alguna Q o $R \leq 30$	(1)			1
V ₄	$Q \geq 30$	(1)	R/Q or $R/S < 0.5$	(2)	3
			R/Q or $R/S < 1$	(1)	
V ₅	$Q \geq 30$	(1)	R/Q or $R/S < 1$	(2)	3
			R/Q or $R/S < 2$	(1)	
V ₆	$Q \geq 30$	(1)	R/Q or $R/S < 1$	(2)	3
			R/Q or $R/S < 3$	(1)	

2.4. ANÁLISIS DE DATOS

Los datos fueron recolectados a través de formularios, tanto para los casos como para los controles. Posteriormente se digitó y organizó una matriz de datos en Microsoft Excel para luego realizar el análisis estadístico con el software

estadístico STATA 10.1. El análisis comparativo entre grupos de observación de variables cualitativas se realizó la prueba de Fisher y la prueba de la χ^2 en tablas de 2 x 2. Para aquellas con observaciones menores de 5 se usó la prueba de Yates. Para las variables cuantitativas de distribución normal se usó el test de student (media, 95%IC) y para las no paramétricas se realizó el test de Kurskal-Wallis, expresando las medias aritméticas y sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Para evaluar la correspondencia entre los niveles de 4-HNE como variable cuantitativa de salida y las demás variables se realizó: (i) entre variables cuantitativas no paramétricas, la prueba de Spearman, (ii) regresión lineal al comparar no paramétricas con aquellas que presentaban distribución normal y (iii) variables cualitativas con cuantitativas no paramétricas se usó mann-Whitney o Kruskal-Wallis.

3. RESULTADOS

3.1. DETERMINACIÓN DE HNE POR HPLC

Los procedimientos de extracción de las hidrazonas carbonílicas del plasma derivatizado de los pacientes con IAM y aquellos sanos requirió el uso de dos columnas usando como fase móvil a: (i). Extrelut®, que ofreció la ventaja de prevenir la formación de emulsiones en la extracción orgánica de las hidrazonas. (ii). Silica gel, que purificó la muestra una gran cantidad de hidrazonas polares. La cuantificación de la concentración plasmática se realizó usando como referencia los tiempos de retención de la molécula patrón y usando la ecuación de la curva de calibración de dicha solución estándar, como se muestra en el anexo A.1.

La concentración más baja que pudo ser estimada estuvo alrededor de 0.1 μM , que fue referido a la cantidad del volumen plasmático inicial (1 mL). El HNE se identificó en tiempos de retención típicos y estables entre 16 y 17 min. En la figura 3.1 se muestran ejemplos de los cromatogramas obtenidos y la coincidencia de los tiempos de retención entre HNE de la muestra *versus* la comparación de con solución estándar de referencia, y en la figura 3.2 se comparan los cromatogramas típicos de una muestra de un paciente sano y uno con IAM.

Figura 3.1. Cromatogramas integrados del estándar HNE-DNPH y de la muestra de un paciente con IAM.

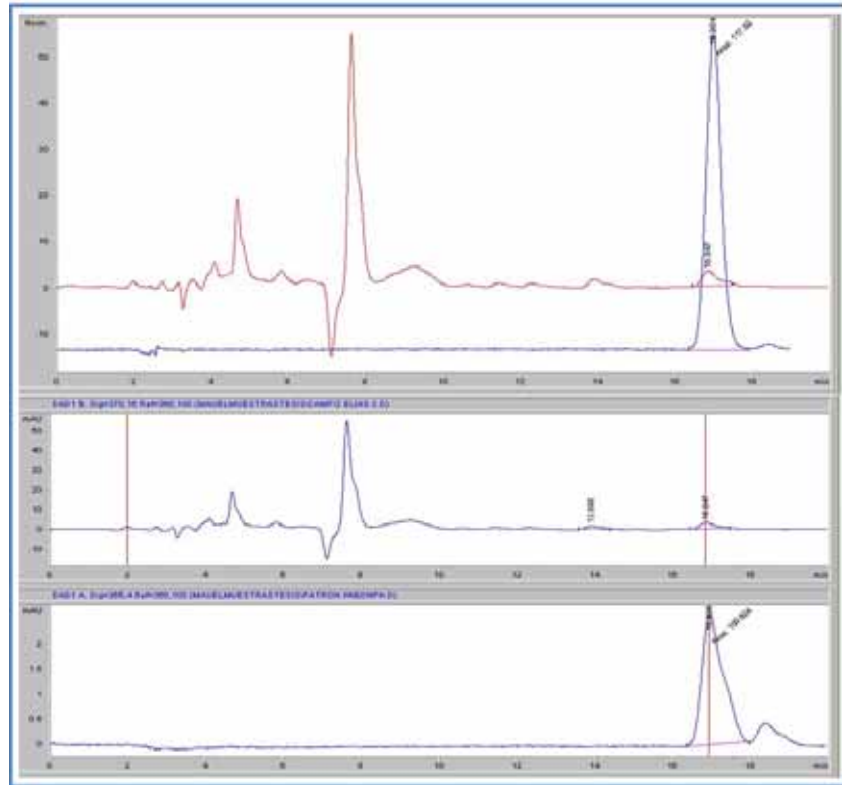
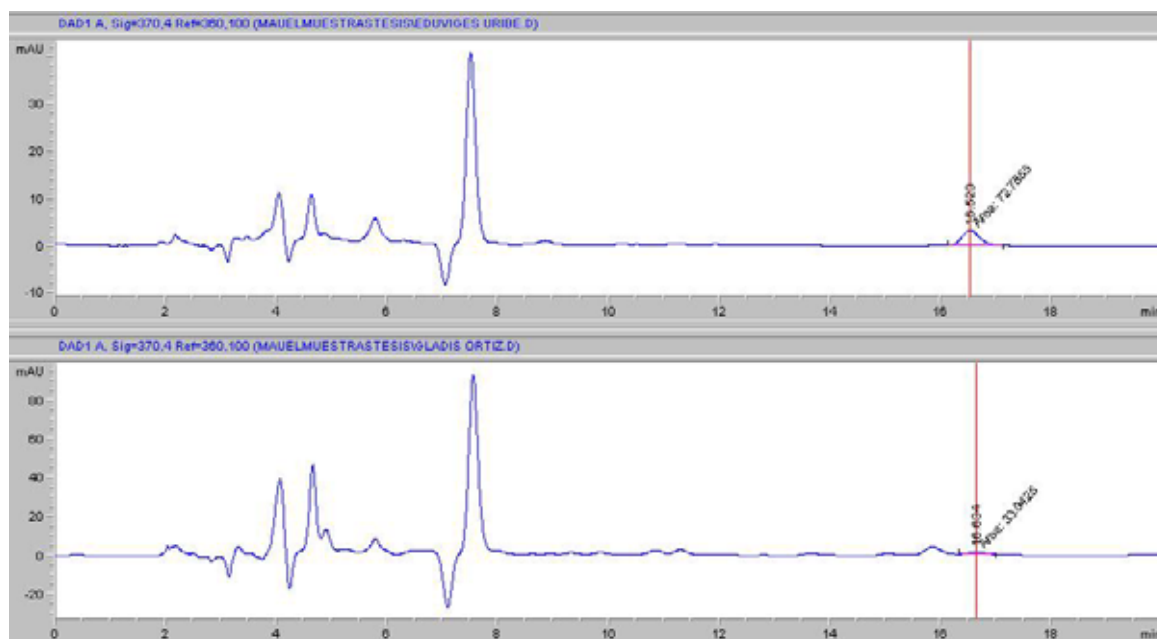


Figura 3.2. Cromatogramas por análisis con HPLC de las muestras de un paciente con IAM y un paciente control.

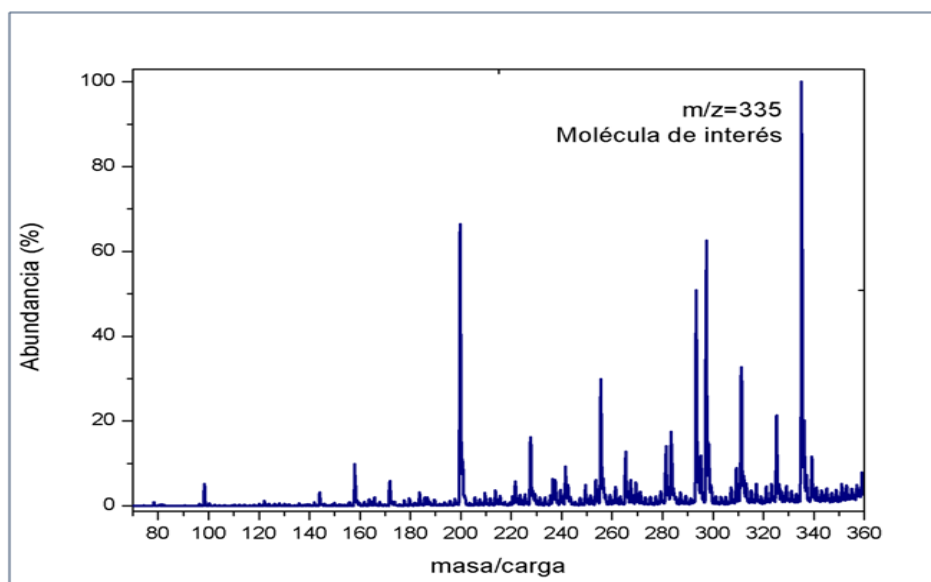


3.2. CONFIRMACIÓN DEL HNE-DNPH POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

La solución estándar de HNE sintetizada orgánicamente fue sometida a procesos de purificación usando en TLC por duplicado, hasta obtenerla con un 96% de pureza. Posteriormente de su análisis cromatográfico (HPLC-RPE) se recolectaron fracciones correspondientes al pico de mayor abundancia, encontrándose aproximadamente a una concentración de $1\mu\text{M}$. De esta forma se inyectó directamente en un espectrómetro de masas, donde se tomaron registros en polaridad negativa y positiva. En modo negativo la solución patrón de HNE-DNPH con una masa molecular de 336 g/mol , mostró un espectro de masas donde se observó el ión molecular de HNE-DNPH con pérdida de un hidrógeno (deprotonado) con una relación masa / carga (m/z) de 355, lo cual ofreció

evidencia inicial de que la muestra analizada contenía la sustancia de interés. La figura 3.3 presenta el espectro obtenido bajo ionización negativa.

Figura 3.3. Espectro de masas de la solución patrón HNE-DNPH sintetizada, y luego purificada por TLC, bajo ionización negativa.



Al analizar la muestra en polaridad positiva se obtuvo un ión de relación $m/z = 337$, que corresponde a la molécula HNE-DNPH con adición de un hidrógeno (protonada), (figura 3.4). Posterior a la identificación de los picos correspondientes con la masa molecular de nuestra molécula se realizó fragmentación para ambas polaridades. En modo positivo se produjo pérdida de 18 unidades ($337-319$) indicando la salida de agua. Adicionalmente, se detectó el ion fragmento de $m/z 167.5$, que corresponde a la pérdida del anillo de la molécula de partida, éste moró ser uno de los picos diagnósticos y que en conjunto con la demás evidencia confirma la identidad de la molécula estudiada (figura 3.5). Por otro lado, la fragmentación de la molécula en modo negativo, permitió la detección del ion de $m/z 288$, originado por la pérdida de 47 unidades (salida de NO_2 y pérdida de un

protón adicional). Adicionalmente, se detectó el fragmento 167, que corresponde nuevamente a la pérdida del anillo de la molécula inicial (figura 3.6). De esta manera, el análisis por espectrometría de masas de la molécula de interés (detección del ion molecular y fragmentación en polaridad positiva y negativa) condujo a la confirmación de la identidad de dicha molécula. Fracciones de los picos correspondientes con los tiempos de retención del patrón de HNE en las muestras de los casos y los pacientes sanos fueron sometidas a este mismo análisis, obteniendo iguales patrones de espectros de masas que confirmaron también en las muestras la autenticidad en la identificación y cuantificación del HNE.

Figura 3.4. Espectro de masas bajo ionización positiva de la solución patrón HNE-DNPH sintetizada, y luego purificada por TLC.

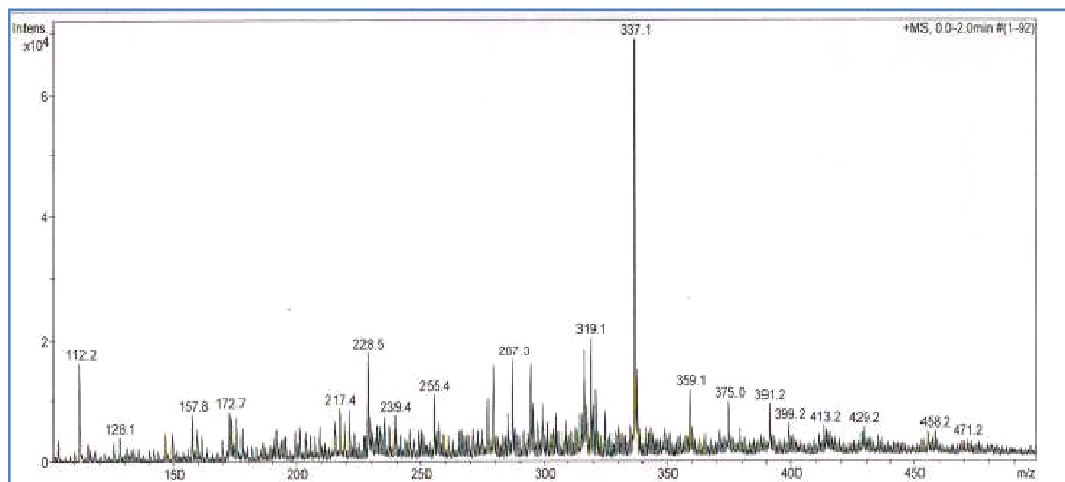


Figura 3.5. Picos de fragmentación del ion molecular identificado en modo positivo.

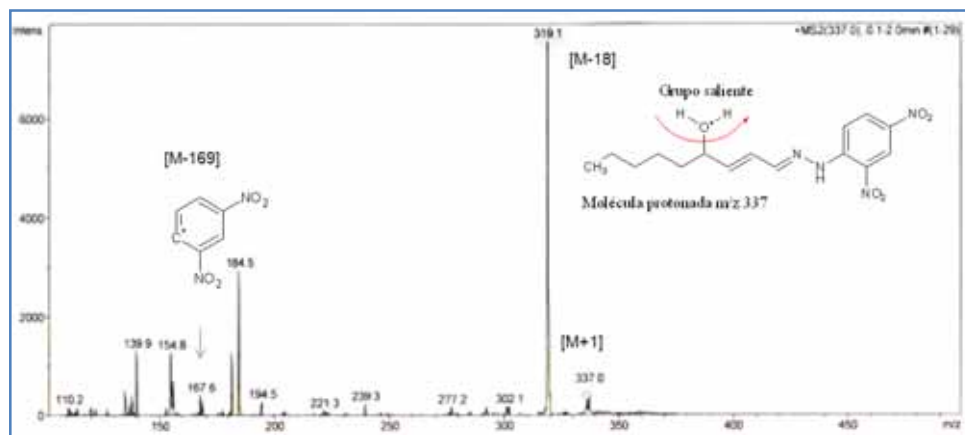
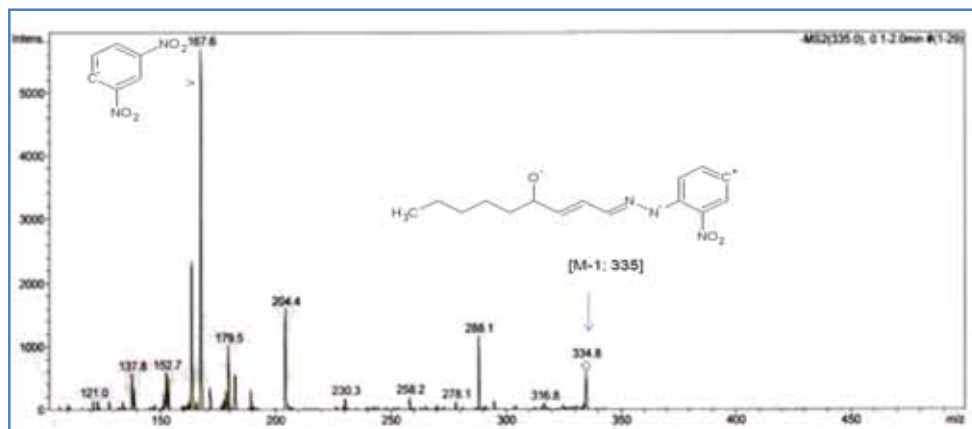


Figura 3.6. Picos de fragmentación del ion molecular identificado en modo negativo.



3.3. ANÁLISIS PAREADO POR GRUPOS DE OBSERVACIÓN.

3.3.1. Variables cualitativas y características generales de la población

En general las prevalencias de los factores de riesgo estudiados fueron iguales en ambos grupos de observación, ninguna de las condiciones de base presentes en cada uno de los grupos presentó diferencias significativas, tal como se describe en la tabla 3.1. Este hecho supone homogeneidad en cuanto a dichas condiciones entre ambos grupos (sanos e IAM). A partir de este análisis, en total se analizaron 42 personas, de los cuales 23 fueron mujeres (55%) y 19 fueron hombres (45%). En el grupo de pacientes sanos hubo 13 mujeres y 7 hombres, y en el grupo de IAM se encontraron 10 mujeres y 12 hombres. No se observaron diferencias por género. En la tabla 3.1 se muestra la comparación de la influencia de las variables sociodemográficas de tipo cualitativo sobre los niveles de HNE en los 42 sujetos estudiados y discriminada por grupo de observación. La hipertensión arterial se destacó como la enfermedad de mayor prevalencia en la población total (n=42) con 63%, de estos vemos mayor porcentaje de hipertensos en el grupo de IAM que en el de los sanos (69.6% vs. 60%), le sigue en frecuencia el tabaquismo con 39.5% que de igual manera resultó con un porcentaje más elevado en el grupo de IAM que en el de sanos. De manera similar las prevalencias generales del EPOC, la dislipidemia y la enfermedad coronaria, al comparar entre grupos mostraron mayores incidencias en el grupo del IAM que en el de sanos. Algunas otras condiciones menos prevalentes para ambos grupos fueron en orden: (i) sedentarismo (ii) diabetes mellitus, (iii) obesidad e insuficiencia cardiaca congestiva (ICC), ambas con un 7%, y (iv) insuficiencia renal crónica (IRC).

3.3.2. Variables cuantitativas

Indicadores generales

La edad promedio de la población fue de 61 entre 40 y 91 años de edad. Se encontró que los pacientes con IAM presentaron mayores edades promedio que los del grupo de individuos sanos en ~ 11.7 años (66.4, entre 51 a 91 años, *versus*. 54.7, entre 40 a 76 años; $p = 0.001$). La tensión arterial media (TAM) fue significativamente mayor en los pacientes con IAM (tomada al ingreso de los pacientes a urgencias) con 120 (100 – 140) mmHg a diferencia de los controles que presentaban una TAM dentro de rangos normales de 95 (85 – 90) mmHg ($p < 0.001$, 95% IC 103 – 112.7, $t = 8.9$). En la tabla 3.1 se muestran en detalle la distribución y las diferencias entre ambos grupos de las variables cuantitativas incluidas en el análisis por grupo de observación.

Marcadores de daño y severidad

Los niveles plasmáticos de HNE se encontraron aproximadamente tres veces más elevados en los pacientes con IAM en su fase aguda, con una concentración media de 2.33 μM (0.21 - 13.3, $n=22$), en relación al grupo de sanos que mostró una concentración promedio de 0.78 μM (0.16 – 1.16, $n=20$), dicha diferencia fue estadísticamente significativa (*Kruskal-Wallis* =7.74, $GL= 1$, $p = 00054$), Estos resultados que se representan en la figura 3.7, y aportan evidencia sobre el posible papel del HNE como biomarcador en el IAM.

El NTproBNP demostró concentraciones circulantes ~ 40 veces mayores en los pacientes con IAM con 3347 ng/mL (73.1 - 35000, $n=22$) en comparación con la concentración plasmática promedio del grupo control 82.9 ng/mL (44.8 - 260, $n = 20$), esta diferencia fue estadísticamente significativa (*Kruskal-Wallis* = 26.6,

$p < 0.0001$, D.F = 1, 73.1 - 35000), respresentado graficamente en la figura 3.5. De la misma manera, los niveles de troponina fueron ≤ 0.001 ng/mL entre los participantes del grupo control, indicando ausencia de muerte y daño isquémico agudo de la célula cardiaca. En contraste, los pacientes con IAM mostraron una media geometrica de 0.34 ng/mL (0.01 – 24.15) diferencias significativas entre ambos grupos (*Kruskal-Wallis* = 30.7, $p = 0.0001$, G.L = 1). Los pacientes con IAM presentaron fracciones de eyección significativamente menores en ~ 10% que aquellos sujetos sanos (55.5%, 25 – 60. vs. 39.5 %, 45 – 70; $p = 0.0001$).

Dentro de la variables que se evaluaron unicamente en el grupo de los pacientes con IAM están: (i) la CK-mb que se mostró elevada en un promedio de 75.3 ng/mL (24.8 – 511.4). (ii) La creatinina que mantuvo sus niveles plasmáticos dentro de rangos normales (1.01 mg/dL , 0.6 – 1.80). (iii) La estancia hospitalaria promedio fue de 20 días (5 - 45) y (iv) el tiempo entre la instauración de los síntomas y la recolección de la muestra fue de 24 horas (10 – 47). La presencia de complicaciones clínicas dentro de los primeros 6 meses del evento coronario agudo se estableció en un 41% de estos pacientes, los pacientes sanos no presentaron complicaciones en este periodo de tiempo.

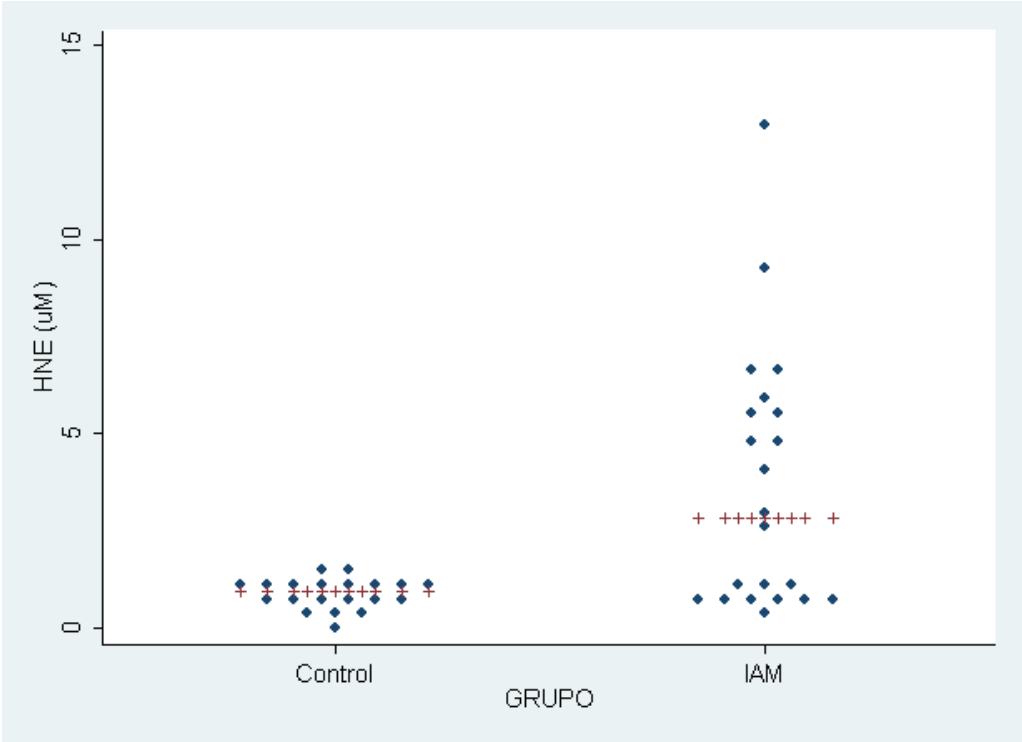
Tabla 3.1. Comparación de las variables del estudio por grupo de intervención.

Variables	Grupo						Estadísticos		
	Sanos		IAM		Total		Fisher	Yates	P
	N	%	n	%	n	%			
<i>Masculino</i>	10	45	12	56	22	52	0.17 ^a	-	
Sexo <i>Femenino</i>	13	65	7	35	20	48		-	0.55
Dislipidemia	4	36	7	64	11	26	0.27 ^b	0.60	0.37
EPOC	1	20	4	80	5	12	0.20 ^a	0.54	0.73
HTA	11	42	15	58	26	62	0.31 ^a	0.57	0.41
Diabetes	0	0	3	100	3	7	-	-	-
ICC	0	0	3	100	3	7	-	-	-
Obesidad	1	25	2	75	3	7	0.29 ^b	1.88	0.17
SCA^c	7	58	5	42	12	29	-	-	0.56
IRC^d	0	0	2	100	2	5	-	-	-
Tabaquismo	6	35	11	65	17	40	1.01 ^a	0.31	0.34
Sedentarismo	3	38	5	63	8	19	0.40 ^b	0.7	0.29
	Media		Media		Media		tstudent	Kwallis	P
Edad^e	66.4 (50.3 - 59.2)		54.7 (61.2 - 71.5)		60.8 (57.1 - 64.6)		3.51	-	0.001
HNE^f(µM)	0.78 (0.60 – 1.02)		2.24 (1.37 – 3.65)		1.3 (0.98– 1.81)		-	7.74	0.005
NTproBNP^f (pg/mL)	82.9 (69.1 - 99.4)		3347(1655.4 - 6767.4)		575.3 (289.5 – 1143.1)		-	26.6	0.0001
Troponina T^f (ng/mL)	<0.001		0.34 (0.13 – 0.89)		0.34 (0.14 – 0.89)		-	30.6	0.0001
FE (%)^f	55.5 (52.4 - 58.6)		39.5 (35.7 - 43.3)		47.1 (43.7 - 50.6)		6.60	-	0.0001
TAM^e(mmHg)	95 (91.9 - 98.1)		119.7 (115.1 - 124.5)		108 (103.2 - 112.8)		8.98	-	0.060

			%				
CKmb^f (ng/mL)	-	79.8 (59.9 – 106.3)	-	-	-	-	-
Creatinina^f (mg/dL)	-	1.01 (0.88 - 1.2)	-	-	-	-	-
Estancia^h (d)	-	20 (15 - 25)	-	-	-	-	-
Complicaciones^g (%)	-	9 (41 %)	9 (28.6)	-	-	-	-
Tempo de Evolución^{e,h}	-	24 (19.4 – 28.6)	-	-	-	-	-

- a. Test de Fisher. b. Test de Yates. c. Antecedentes de síndrome coronario agudo. d. Insuficiencia renal crónica. e. Variable cuantitativa de distribución normal, expresada como media aritmética y 95% IC. f. Variable cuantitativa de distribución no paramétrica, expresada como media geométrica y 95% IC. g. Frecuencia y porcentaje. h. Tiempo transcurrido en horas entre el inicio de los síntomas y la recolección de la muestra. h. Días de estancia hospitalaria.

Figura 3.7. Distribución de los niveles de HNE por grupo de observación.



mayores niveles de HNE aquellos que presentaron complicaciones comparados con lo que no las presentaron, no obstante estas diferencias no resultaron significativas ($P = 0.20$). En el mismo orden, el desarrollo de desenlaces fatales a los 6 meses de mostró relacionarse con un aumento significativo en los valores plasmáticos de HNE en el grupo de pacientes con IAM ($n=22$, Kruskal-Wallis = 7.30, $P = 0.007$), lo que podría llegar a ser una evidencia a tener en cuenta al considerar su capacidad pronóstica en el IAM.

Tabla 3.2. Análisis bi-variado entre las condiciones de base de la población y las concentraciones de HNE en los pacientes con IAM.

Variables	<i>Media HNE^a</i>		<i>Estadísticos</i>		
	Comorbilidad		<i>KWallis</i>	<i>GL</i>	<i>P</i>
	<i>Presente</i>	<i>Ausente</i>			
Dislipidemia	2.78	2.43	0.77	1	0.37
EPOC	2.81	2.26	0.12	1	0.73
HTA	2.57	1.94	0.66	1	0.41
Diabetes	2.85	2.29	0.002	1	0.96
ICC	9.31	1.80	5.49	1	0.01
Obesidad	4.92	2.13	1.88	1	0.17
SCA^b	2.50	2.30	0.34	1	0.56
IRC	3.36	3.35	0.13	1	0.72
Tabaquismo	3.42	1.67	0.90	1	0.34
Sedentarismo	3.47	2.10	1.12	1	0.29
Complicaciones^c	5.01	1.60	1.30	1	0.20
Desenlace^d	7.80	1.60	7.30	1	0.007

a. Concentración promedio de HNE (μM). b. Antecedente de enfermedad coronaria. c. presencia de complicaciones de cualquier tipo dentro de los primeros 6 meses del IAM. d. Desarrollo de desenlace fatal dentro de los primeros seis meses del AM. e. Media geométrica.

3.4.2. Variables cuantitativas

Correlación entre variables medidas en ambos grupos.

La edad mostró no tener influencia sobre los valores de HNE, exhibiendo una variación independiente de sus valores plasmáticos con solo una correlación del 4% ($r^2 = 0.04$, F -test = 0.22, $P = 0.64$), de manera similar se comportó para los niveles de NTproBNP ($r^2 = 0.02$, $F = 1.51$, $P = 0.23$). Así mismo las diferencias entre géneros no fueron significativas, de modo que el género mostró ser independiente respecto a los niveles de HNE (Mann-Whitney = 0.35, GL = 1, $P = 0.55$), y con los de NTproBNP (Mann-Whitney = 0.027, GL = 1, $P = 0.86$).

De todas las variables analizadas, el NTproBNP y la TAM fueron las únicas que mostraron correlaciones significativas con el HNE, tanto en el total de los individuos ($n=42$) como en el grupo de pacientes con IAM ($n=22$). La mejor correlación se obtuvo entre el HNE y el NTproBNP en el grupo de pacientes con IAM con un 68%, ($r_{\text{spearman}} = 0.68$, $P = 0.0005$, $n = 22$) comparado con un 48% para ambos grupos ($r_{\text{spearman}} = 0.48$, $P = 0.001$). Esta diferencia podría ser explicada por la dispersión encontrada sobre los valores de NTproBNP, así como por la diferencia en el delta de los valores promedio entre los pacientes sanos y aquellos con IAM, que fue 40 veces mayor para el NTproBNP y tan solo 3 veces para el HNE. La TAM mostró igual comportamiento, con ~ 55% como el mejor nivel de correlación en el grupo de pacientes con IAM ($r^2 = 0.55$, $p = 0.0001$, $F = 26.20$, $n = 22$). La correlación TAM vs. NTproBNP fue más baja tanto en la población total con 32% como para el grupo con IAM en un 17%, ambos no significativos.

Tanto los niveles de troponina como los de FE mostraron buenas y significativas correlaciones con las concentraciones de HNE cuando se incluye la población total (troponina: 53%, FE: 23%) y menores correlaciones no significativas cuando se

analizan en los pacientes con IAM. Con el NTproBNP se vio el mismo patrón que el ya descrito para el HNE en ambas mediciones. Notablemente la troponina mostró la mayor capacidad de predecir el desenlace asumiendo una correlación del 80 % con el NTproBNP ($r_{\text{spearman}} = 0.80$, $p < 0.0001$). El análisis detallado de este grupo se muestra en la tabla 3.3.

Correlación para variables medidas en el grupo de IAM

Los valores plasmáticos de HNE mostraron bajas correlaciones no significativas con: (i) la CK-mb ($r_{\text{spearman}} = 0.36$, $p = 0.096$), (ii) la creatinina sérica ($r^2 = 0.13$, $P = 0.058$), (iii) la escala de riesgo TIMI ($r^2 = 0.0005$, $P = 0.9$), (iv) el tiempo de evolución ($r^2 = 0.001$, $P = 0.9$) y (v) los días de estancia hospitalaria ($r^2 = 0.12$, $P = 0.07$). Se destaca como el grado más alto de correlación existente en este grupo, el de la creatinina sérica con un 13%.

El NTproBNP mostró correlaciones significativas con la creatinina ($r^2 = 0.21$, $P = 0.02$) y los días de estancia hospitalaria ($r^2 = 0.40$, $P = 0.001$). Las demás variables que incluyeron CK-mb, TIMI y tiempo de evolución mostraron ser independientes de los niveles de NTproBNP. El resumen del análisis bi-variado y de correlación en los niveles plasmáticos de HNE respecto a las variables analizadas, se muestra en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Análisis de correlación entre los niveles plasmáticos de HNE y NTproBNP según las variables cuantitativas del estudio en las pacientes que presentaron IAM.

Variables	HNE						NTproBNP					
	IAM			n = 42			IAM			n = 42		
	r ²	r _{sp}	P	r ²	r _{sp}	P	r ²	r _{sp}	P	r ²	r _{sp}	P
HNE	-	-	-	-	-	-	-	0.38	0.08	-	0.53	0.003
Troponina ^b		0.38	0.08		0.53	0.003	-	0.28	0.21	-	0.80	0.001
NTproBNP ^b	-	0.67	0.0005	-	0.48	0.001	-	-	-	-	-	-
FE ^a	0.08	-	0.20		0.23	0.001	0.08	-	0.20	0.15	-	0.007
TAM ^a	0.55	-	0.0001	0.54		0.0001	0.17	-	0.06	0.32		0.001
TIMI	0.0005	0.23	0.9	-	-	-	0.03		0.53	-	-	-
Creatinina ^a	0.13	-	0.06	-	-	-	0.21	-	0.02	-	-	-
CKmb ^b	-	0.36	0.09	-	-	-	-	0.23	0.30	-	-	-
EVOLUCION ^{a,c}	0.001	-	0.88	-	-	-	0.10	-	0.08	-	-	-
ESTANCIA ^{a,d}	0.16	-	0.06	-	-	-	0.40	-	0.001	-	-	-

a. La regresión lineal se aplicó al cruce con variables de distribución normal. b. La prueba de Spearman se realizó para las variables que presentaron una distribución no paramétrica. c. Tiempo entre el inicio de los síntomas y la recolección de la muestra. d. Días de estancia hospitalaria.

3.5. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS

3.5.1. Localización del infarto

En este estudio la distribución de la localización de los infartos en los pacientes fue: IAM inferior con 36.4%, siguiéndole el antero-septal (31.8%), y luego el anterior (18.2%). Los pacientes que desarrollaron IAM antero-septal mostraron tener las mayores concentraciones de HNE en plasma (5.4 μM , 0.85 – 13.1) , seguido de IAM inferior (3.5 μM , 0.21 - 9.30) y del IAM anterior (2.2 μM , 0.75 – 4.70). El IAM lateral (2.0 μM , 0.90 – 3.07), y el postero-inferior (0.58) cursaron con las menores concentraciones. Para los valores de NTproBNP también el IAM antero-septal mostró mayores concentraciones (11561 pg/mL, 249 - 3500), le siguen en su orden el lateral, el inferior, el anterior y el postero-inferior. Estos resultados se exponen con más detalle en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Localización del infarto agudo del miocardio

Localización	Frecuencia	Porcentaje (%)	HNE (μM) ^a	NTproBNP ^a
Inferior	7	31,8	3.5	8561
Anterior	4	18,2	2.2	1286
Antero-septal	8	36,4	5.4	11561
Postero-inferior	1	4,5	0.58	661
Lateral	2	9,1	2.0	10967
Total	22	100	3.66	81889

a. Media

3.5.2. Tamaño del Infarto

En la tabla 3.5 se muestran los resultados de la distribución encontrada entre los niveles de HNE, complicaciones y aparición de desenlaces fatales, respecto al tamaño del infarto en tres grupos según el sistema de puntuación de Silvester (88).

Tabla 3.5. Tamaño del infarto de acuerdo a los niveles de HNE, complicaciones y desenlaces fatales a los 6 meses de seguimiento.

Tamaño	Biomarcadores		Desenlace (%)		Complicaciones (%)			
	Frec.	%	HNE (μM) ^a	NTproBNP (ng/mL) ^a	Vivos	Muertos	Si	No
<15%	8	36.4	0.75	2218	100	0	25	75
18-24%	4	18.2	1.98	6170	75	25	50	50
>27%	10	45.5	6.66	13773	50	50	60	40
Total	22	100	3.66	8189	-	-	-	-

a. Promedio \pm DE.

Se observó que un 36.4% de los sujetos desarrollaron un daño del tejido cardiaco $\leq 15\%$, no presentaron desenlaces fatales y un 25% presentaron complicaciones, a este grupo de pacientes con el menor tamaño de infarto, correspondieron las menores concentraciones de HNE (0.75 μM , 0.21 – 1.01) y NTproBNP (2218 pg/mL, 73.1 - 8477). Un 18.2% de los pacientes estudiados presentaron un Infartos miocárdicos entre el 18 y el 24% de tamaño, de esto un 25% desarrollaron desenlaces fatales y un 50% presentaron algún tipo de complicación, los niveles de HNE (1.98 μM , 1.16 – 3.07) y NTproBNP (6170 pg/mL, 1257 - 13456) exhibieron valores intermedios. El otro 45.5% de los sujetos mostraron tener un

tamaño del infarto \geq del 27%, de los cuales se obtuvieron los más altos niveles de HNE con 6.66 μ M, (4.18 – 13.1) y de NTproBNP con 13773 pg/mL (73.1 – 35000), de los cuales además presentaron desenlaces fatales hasta un 50%, y por otro lado un 60% de ellos presentaron algún tipo de complicación. En general, el tiempo de estancia hospitalaria fue de 20 días en promedio, un 45.5% de todos los casos presentaron complicaciones y otro 27.3% desarrollaron desenlaces fatales. El tamaño del infarto y los niveles de HNE presentan una correlación muy buena y estadísticamente significativa del 92.4%, ($r^{sp} = 0.924$, $p < 0.0001$). De la misma forma las concentraciones de NTproBNP también presentaron buenos niveles de asociación en un 60% ($r^{sp} = 0.60$, $p = 0.003$). De este modo la presente evidencia muestra relación de proporcionalidad entre el grado de daño del tejido cardiaco (representado por el tamaño del infarto y los niveles plasmáticos de algunos de los biomarcadores de daño tisular expuestos en este estudio), y los niveles circulantes en plasma de HNE encontrados, tal como se representa en la figura 3.9.

4. DISCUSIÓN

Las concentraciones plasmáticas de HNE en pacientes con infarto agudo del miocardio se encuentran elevadas al compararlos con los niveles plasmáticos de sujetos sin síndrome coronario agudo. Además, las variaciones en los niveles plasmáticos observados de HNE se relacionan de manera proporcional y significativa con las del NTproBNP y con el tamaño de la zona infartada. Estos hallazgos parecen indicar que la medición del HNE en el IAM podría reflejar la magnitud del daño oxidativo en la fase aguda de dicha patología.

Los factores de riesgo más importantes en síndrome coronario agudo en el mundo, son el hábito de fumar y la dislipidemia (14, 78) En Latinoamérica la prevalencia de tabaquismo (30%), obesidad (23%), síndrome metabólico (20%), hipertensión (18%), hipercolesterolemia (14%), diabetes (7%) y placa carotídea (8%) contribuyen con dicha patología (14, 79, 80). Concuerdan con el perfil de la población incluida en el presente trabajo. Los niveles plasmáticos del HNE no se encontraron influenciados por dichos factores de riesgo ni por otras variables demográficas tales como la edad y el sexo. Los antecedentes de ICC en pacientes con IAM parecen condicionar niveles altos de HNE, así como la presencia de desenlaces fatales a los 6 meses y la aparición de complicaciones. Esta evidencia puede llegar a ser de gran relevancia a la hora de considerar futuros estudios sobre HNE como biomarcador, al permanecer en niveles no detectables en personas sin infarto pero con factores de riesgo que pudieran elevarlo como sucede con el NTproBNP (6-41) y que lo limitan en su uso por interferir en el establecimiento de puntos de corte. Como evidencia de esto en nuestro estudio, encontramos correlaciones significativas entre el NTproBNP y los niveles de creatinina que a pesar de mantenerse en el rango normal lograron explicar en parte las variaciones del NTproBNP. En este sentido el HNE fue completamente independiente.

La liberación del BNP tiene una función endocrina y fisiológica importante que obedece a varios tipos de estímulos (39, 42). En contraste la elevación de los niveles circulantes del HNE en pacientes que desarrollaron IAM en este estudio, dependería directamente del daño celular que ocurre en la patología, como sucede con la troponina T. De hecho hubo buena correlación entre la troponina T y el HNE al incluir ambos grupos en el análisis (sanos e IAM). Del mismo modo, se puede tener en cuenta la similitud en los patrones de variación que existió entre el NTproBNP y el HNE respecto a la presentación de correlaciones significativas entre marcadores de daño y pronóstico como FE, troponina T y CK-mb que apoya la posible utilidad del HNE como biomarcador en el IAM.

La poca correlación entre el HNE y el tiempo de evolución hasta el momento de recolección de la muestra (que osciló entre 10 y 47 horas a partir del inicio de los síntomas) ofrece una idea de la estabilidad en los niveles de plasmáticos HNE durante la fase aguda del IAM, indicando que las variaciones observadas encontradas para HNE, son independientes del momento en que se recoja la muestra, disminuyendo la probabilidad de que el tiempo en el que la muestra es recolectada influya sobre la medición. Este hecho cumple con una de las características que un biomarcador debería cumplir (26 - 27).

En la fisiopatología y presentación clínica de los síndromes coronarios agudos, especialmente en el IAM suelen estar asociadas descargas de tipo adrenérgico, estados ansiosos, así como a los mecanismos homeostáticos propios de tal condición (4), sumado al hecho de que aproximadamente más de un 60 % de los participantes presentaban de base HTA, podrían explicar los hallazgos sobre la marcada diferencia de TAM entre los pacientes sanos y aquellos con IAM.

En la actualidad los niveles fisiológicos del HNE en el plasma sigue siendo objeto de estudio, sin embargo actualmente se toman como valores normales menores

de 0.1 μM (8, 74). Selley y cols., determinaron que en pacientes aparentemente normales los valores de HNE se encuentran alrededor de $0.68 \pm 0.40 \mu\text{M}$ (72), del mismo modo, mas recientemente Strohmaier y cols., encontraron valores promedios entre $0.65 \pm 0.39 \mu\text{M}$ (73). Los valores plasmáticos de HNE encontrados en los pacientes controles del presente estudio muestran cercana concordancia con los valores reportados como normales en la literatura científica.

Los efectos biológicos del HNE en concentraciones entre 1 y 20 μM han demostrado inhibir la síntesis de ADN y de proteínas, estimular la fosfolipasa A_2 y la expresión del proto-oncogen c-myc. Todos estos efectos suceden en los tejidos como respuesta al estrés y daño oxidativo (8). De acuerdo con esto, vemos que el promedio (2.23 μM) detectado en los pacientes con IAM en este estudio se encuentra en este rango tóxico, que podría modificar negativamente las respuestas de reparación y restauración del tejido cardiaco. La expresión de las enzimas que detoxifican a lo aldehídos en la célula tal como la aldehído deshidrogenasa II, que es de expresión exclusiva del tejido cardiaco e interviene en el pre-acondicionamiento miocárdico, participan en los mecanismos de defensa del musculo cardiaco contra el infarto isquémico. En esta línea, Chen y cols., encontraron que induciendo la actividad de estas enzimas en corazón de roedores, disminuían el tamaño del infarto hasta en un 40% (84). En consecuencia la generación de aldehídos tóxicos en concentraciones patológicas tiene un papel significativo en la determinación del tamaño en el IAM. En concordancia con estas investigaciones, los niveles de HNE medidos en este estudio guardan relación lineal con el tamaño del infarto, al mismo tiempo que a sus complicaciones y mortalidad.

El NTproBNP además del estrés mecánico, puede ser liberado por algunos otros estímulos como condiciones de hipoxia, que en muchos casos pueden hacer parte de un mismo cuadro fisiopatológico (39 - 41). Según nuestros hallazgos, la

producción de HNE se comporta de manera similar a la liberación del NTproBNP frente a variables como el tamaño del infarto, presencia de complicaciones y desenlaces fatales encontrados en este estudio, sin embargo, el HNE cuenta además con algunas características propias de los principales marcadores de daño del músculo cardíaco como la troponina T. El HNE tendría posibilidades en la detección temprana, diagnóstico, monitoreo de la progresión del cuadro clínico y estratificación de riesgo en el infarto agudo de miocardio teniendo en cuenta lo que observamos en este análisis (37).

5. CONCLUSIONES

El 4HNE y el NTproBP se encuentran elevados en el plasma de los pacientes con IAM en comparación con los controles sanos de manera significativa.

Existe una buena correlación positiva entre los niveles de 4HNE y los niveles de NTproBNP en el IAM. Del mismo modo, el HNE mostró correlaciones positivas con los marcadores específicos de daño tisular como la troponina T y la CK-mb en los pacientes con IAM.

Los pacientes que presentaron IAM mostraron que a medida que las concentraciones plasmáticas de HNE eran más altas, había un aumento proporcional con el tamaño del infarto, del porcentaje de complicaciones y de desenlaces fatales al cado de seis meses del evento agudo.

Las variaciones observadas en los tiempos en que se extrajeron las muestras después del inicio del dolor, así como también las observadas en los valores séricos de creatinina de los pacientes con IAM, no demostraron influir sobre las concentraciones plasmáticas de HNE.

El comportamiento de los niveles plasmáticos de 4HNE en pacientes con IAM durante su fase aguda podrían aumentar en relación con la magnitud y extensión del daño oxidativo del tejido cardiaco isquémico.

Nuestros resultados sugieren que los niveles de 4HNE medidos en plasma de pacientes con IAM en su fase aguda pueden llegar a ser un buen indicador de daño celular y severidad de daño del tejido cardiaco, por lo tanto valdría la pena investigar a profundidad su uso como biomarcador en el IAM.

6. RECOMENDACIONES

- Desarrollar investigaciones a mayor escala que usen métodos más sencillos, rápidos y económicos para la cuantificación del HNE, como por ejemplo a través de anticuerpos monoclonales o policlonales y aductos proteícos, disponibles en el mercado.
- Asociar mediciones de actividad enzimática del grupo de enzimas tipo aldehído deshidrogenasa, así como algunos otros tipos enzimáticos relacionados con el balance oxidativo.
- Realizar mediciones de control de antioxidantes séricos tipo Vitamina E y ácido ascórbico, evaluando simultáneamente su efecto sobre los valores de HNE y los resultados clínicos.
- Realizar nuevos estudios de tipo epidemiológico, que usen poblaciones con muestras representativas que permitan emitir recomendaciones sobre la población general.
- Desarrollar experiencias adicionales dirigidas a: (i) evaluar la utilidad clínica del HNE en las distintas presentaciones de la enfermedad coronaria aguda, y de esta forma verificar su utilidad en presentaciones de distinto grado de severidad, (ii) evaluar su comportamiento en el tiempo, y (iii) evaluar su valor pronóstico.
- Recomendamos ante la experiencia de esta investigación que para las nuevas investigaciones que ensayen la metodología empleada en este estudio en la determinación de aldehídos en el IAM, explorar el patrón diferencial del espectro de aldehídos encontrados en plasma que puedan estar presentes en

los pacientes con IAM y no es los sanos. De tal forma que se puedan encontrar algunos otros nuevos metabolitos de gran utilidad.

7. ESTRATEGIAS DE PUBLICACIÓN

Los resultados de este trabajo fueron presentados en:

XXIX CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA – CLAQ 2010

XVI CONGRESO COLOMBIANO DE QUÍMICA

Realizado en Cartagena, Colombia del 27 al 01 de octubre de 2010.

Con la participación el siguiente trabajo:

“Evaluación del 4-hidróxinonenal como indicador bioquímico no invasivo de estrés tisular en la fase aguda del infarto agudo del miocardio.”

Se realizó en presentación oral la conferencia titulada: **“Estrés oxidativo como indicador de daño oxidativo en la fase aguda del infarto agudo del miocardio”** en el departamento de Química Analítica y Fisicoquímica ante los miembros del departamento, becarios y docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires Capital Federal, Argentina.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.* 1995; 57: 791–804.
2. <http://www.minproteccionsocial.gov.co/VbeContent/NewsDetail.asp?ID=15895&IDCompany=3> Situación de Salud en Colombia Indicadores Básicos. *Salud Pública* 20/03/2007.
3. www.paho.org (Pan American Health Organization).
4. Antman E, Braunwald E. Acute Myocardial Infarction. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 14th edition 1998; 1:1352.
5. Morrow DA, de Lemos JA, Blazing MA, Sabatine MS, Murphy SA, Jarolim P, White HD, Fox KA, Califf RM, Braunwald E. Prognostic value of serial B-type natriuretic peptide testing during follow-up of patients with unstable coronary artery disease. *JAMA.* 2005; 294:2866-2871.
6. Blankenberg S, McQueen MJ, Smieja M, Pogue J, Balion C, Lonn E, Rupprecht HJ, Bickel C, Tiret L, Cambien F, Gerstein H, Münzel T, Yusuf S; HOPE Study Investigators. Comparative impact of multiple biomarkers and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in the context of conventional risk factors for the prediction of recurrent cardiovascular events in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. *Circulation.* 2006; 114(3):201-208.
7. Tsimikas S. Oxidative biomarker in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2006; 4;98(11A):9P-17P.
8. Esterbauer H, Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. & Med.* 1991; 11:81-128.
9. B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford Science Publications, Oxford 1999.

10. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326:310-318.
11. Goldring C, Casini A.F, Maelaro E, Del Bello B, and Comporti M. Determination of 4-Hidroxy-nonenal by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Lipids.* 1993; 28: 141-145.
12. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, Winterbourn CC. Plasma Concentrations of Myeloperoxidase Predict Mortality After Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 22:49(20):1993-2000.
13. Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Gibson CM, Murphy SA, Rifai N, McCabe C, Antman EM, Cannon CP, Braunwald E. Multimarker approach to risk stratification in non-ST elevation acute coronary syndromes: simultaneous assessment of troponin I, C-reactive protein, and natriuretic peptide. *Circulation.* 2002; 105:1760-1763.
14. Beltrán R, Bohórquez J. B, Bohórquez R, Díaz J.G, García T, Guerra P, Hernández H.J, Hernández E, Herrera M, Isaza D, Gracia M, Gómez E, Guerra P. Guías colombianas de cardiología Síndrome coronario agudo con elevación del ST. 2010; 17(3):121-128.
15. Zarco P. Bases moleculares de la cardiología clínica. En: Los radicales libres y el problema de la isquemia-reperfusión, Madrid; Editorial Médica Panamericana; 1996. 199-220.
16. Weiss N, Keller C, Hoffmann U, Loscalzo J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc. Med.* 2002; 7: 227-239.
17. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, Inflammation and genetics. *Circulation.* 1995; 91:2488-2496.

18. Williams KJ, Tabas I. The report to the retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler. Thromb.* 1995; 15:551-561.
19. Moreno, P.R, Falk E, Palacios I.F, Newell J.B, Fuster V, Fallon J.T. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: Implications for plaque rupture. *Circulation.* 1994; 90 (2): 775-778.
20. Falk E, Shah P.K, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation.* 1995; 92 (3): 657-671.
21. Gensini G, Dilaghi B. The unstable plaque. *European Heart Journal Supplements.* 2002; 4 (Supplement B): B22–B27.
22. Vilariño J, Esper R, Badimón J. Fisiopatología de los síndromes coronarios agudos. Tres paradigmas para un nuevo dogma. *Rev. Esp. Cardiol.* 2004; 4(Supl G): 13-24.
23. Bueno Y. Análisis proteómico en plasma de pacientes con eventos coronarios agudos. Tesis de maestría en Ciencias Básicas, especialidad Bioquímica. Universidad Industrial de Santander. 2010.
24. González R, Cañizares M. Estudio espacial del segmento ST. *BFMC* 2004; 5(3): 23-29.
25. Buja M. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiov. Pathol.* 2005; 14: 170– 175.
26. Rubio R. 2003. Revisión sobre la utilidad de los marcadores séricos cardíacos. Zaragoza. [Web en línea]. Disponible en internet en <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003663.htm>. [Con acceso el 26 de marzo de 2009].
27. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001; 69:89-95.
28. Abuja P. M, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins, *Clin. Chim. Acta.* 2001; 306:1–17.

29. Göran K. Hansson. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 1685-95.
30. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis N. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010; 48: 504–511.
31. Hartford M, Wiklund O, Hultén LM, Persson A, Karlsson T, Herlitz J, Hulthe J, Caidahl K. Interleukin-18 as a predictor of future events in patients with acute coronary syndromes. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30(10):2039-2046.
32. Weseler A, Bast A. Oxidative stress and vascular function: Implications for pharmacologic treatments. *Curr. Hypert. Rep.* 2010; 12(3):154-161.
33. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 2002; 30(6):620-650.
34. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* 2004; 555:589-606.
35. Loftus I, Thompson M. The role of matrix metalloproteinases in vascular disease IM Loftus and MM Thompson. *Vasc. Med.* 2002; 7:117–133.
36. Rebhia L, Omezzinea A, Belhadjmbareka I, Rejeba J, Bouchhimaa M.A, Amria W, Benrejeba N, Nablia N, Abdelazizb A, Zemnic J, Boughzalac E, Bouslama A. B-type natriuretic peptide is a prognostic marker after myocardial infarction: Two-years survival study of 86 patients. *Immuno-Analyse Et Biologie Specialisee.* 2010; 25(5-6):266-271.
37. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358:2148 – 2159.
38. Charpentier J, Luyt CE, Fulla Y, Vinsonneau C, Cariou A, Grabar S, Dhainaut JF, Mira JP, Chiche JD. Brain natriuretic peptide: a marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis. *Crit. Care. Med.* 2004; 32(3):660–665.

39. Martinez-Rumayor A, Richards A. M, Burnett J.C., Januzzi JL. Biology of the natriuretic peptides. *Am. J. Cardiol.* 2008; 101[suppl]:3A–8A.
40. Baggish A.L, van Kimmenade R. J, Januzzi J.L. Amino-terminal pro–B-type natriuretic peptide testing and prognosis in patients with acute dyspnea, including those with acute heart failure. *Am. J. Cardiol.* (2008); 101[suppl]:49A–55A.
41. Baggish A.L, van Kimmenade R. J, Januzzi J.L. The differential diagnosis of an elevated amino-terminal pro–B- natriuretic peptide level. *Am. J. Cardiol.* 2008; 101[suppl]:43A–48A.
42. Troughton R.W, Richards A.M. Outpatient monitoring and treatment of chronic heart failure guided by amino-terminal pro–B-type natriuretic peptide measurement. *Am. J. Cardiol.* 2008; 101[suppl]:72A–75.
43. De Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet.* 2003; 362:316 –322.
44. Hama N, Itoh H, Shirakami G, Nakagawa O, Suga S, Ogawa Y, Masuda I, Nakanishi K, Yoshimasa T, Hashimoto Y. Rapid ventricular induction of brain natriuretic peptide gene expression in experimental acute myocardial infarction. *Circulation.* 1995; 92:1558–1564.
45. Omland T, de Lemos J.A. Amino-Terminal Pro–B-Type Natriuretic Peptides in stable and unstable ischemic heart disease. *Am. J. Cardiol.* 2008 ;101[suppl]:61A–66A.
46. Ma KK, Ogawa T, de Bold AJ. Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by proinflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004; 36(4):505–513.
47. Tanaka T, Kanda T, Takahashi T, Saegusa S, Moriya J, Kurabayashi M. Interleukin-6-induced reciprocal expression of SERCA and natriuretic peptides

- mRNA in cultured rat ventricular myocytes. *J. Int. Med. Res.* 2004; 32(1):57–61.
48. Valente S, Lazzeri C, Chiostrì M, Giglioli C, Sori A, Tigli S, Gensini GF. NT-proBNP on admission for early risk stratification in STEMI patients submitted to PCI. Relation with extension of STEMI and inflammatory markers. *Int. J. Cardiol.* 2009; 132(1):84-9.
 49. Latini R, Masson S. Valor pronóstico de las troponinas circulantes en la insuficiencia cardíaca. *Rev. Esp. Cardiol.* 2008; 61(7): 667-669
 50. Howie-Esquivel J, White M. Biomarkers in Acute Cardiovascular Disease *J. Cardio. Nurs.* 2008; 23(2):124-131.
 51. Cerne D, Lukac -Bajalo J. Oxidative stress assays for disease risk stratification. *Acta Pharm.* 2006; 56:1–17.
 52. Molavi B, Mehta JL. Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. *Curr. Opin. Card.* 2004; 19:488-493.
 53. Murphy E, Glasgow W, Fralix T, Steenbergen C. Role of lipoxygenase metabolites in ischemic preconditioning. *Circ. Res.* 1995; 76: 457-467.
 54. Brill, A. Cellular mechanisms of cardiac arrhythmias in the ischemic and reperfused heart. *EXS.* 1996. 76; 135-153.
 55. Kita Y, Ohkubo K, Hirasawa Y, Katayama Y, Ohno M, Nishino S Kato M, Yoshida K. FR144420, a novel, slow, nitric oxide-releasing agent. *Eur. Pharmacol.* 1995; 275: 125-130.
 56. Pirela V.J.B., Bracho V., Arias F.A.B., Reyes M.T.M., Pacheco, M.N., de Díaz. Malondialdehyde and nitric oxide behaviour in patient with myocardial infarction. *Rev. Esp. Cardiol.* 2000; 53 (4):502-506.
 57. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.* 1998; 44:1309– 1315.

58. Llesuy S, Evelson P, Campos AM, Lissi E Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures. A critical review. *Biol. Res.* 2001; 34: 51–73.
59. Packer L (ed) (1984, 1990, 1994, 1999). *Methods in Enzymology*, Vol. 105, 186, 234, 299, 300.
60. Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR (eds.) (1991). *Techniques in Free Radical Research*. Elsevier, Amsterdam.
61. Mason RP (1996). In vitro and in vivo detection of free radicals metabolites with ESR. In: *Free Radicals: A Practical Approach*, Punched NA, Kelly FJ (eds). IRL Press, Oxford, England, pp 11–24.
62. Halliwell B, Kaur H Hydroxylation of salicylate and phenylalanine as assays for hydroxyl radicals: A cautionary note revisited for the third time. *Free Radic. Res.* 1997; 27: 239–244.
63. Biaglow JE, Manevich Y, Uckum F, Held KD. Quantitation of hydroxyl radicals produced by radiation and copper-linked oxidation of ascorbate by 2-deoxy-D-ribose method. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22: 1129–1138.
64. Kutham H, Ullrich V, Estabrook RW. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. *Biochem. J.* 1982; 203: 551–558.
65. Amano F, Noda T Improved detection of nitric oxide radical (NO) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger, carboxy PTIO and Griess reagent. *FEBS Lett.* 1995; 368: 425–428.
66. Fairbarian DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: A comprehensive review. *Mutat. Res.* 1995; 339: 37–59.
67. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environments of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disul. de/glutathione couple. *Free Rad. Biol. Med.* 2001; 30: 1191–1212.
68. Esterbauer H. Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Pathol. Biol.* 1996; 44: 25–28.

69. Levine RL, Wehr N, Wikkiams JA, Stadtman ER, Shacter E. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol. Biol.* 2000; 99:15–24.
70. Wheatley R.A. Some recent trend in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends in analytical chemistry.* 2000; 19(10): 617-628.
71. Michel P, Eggert W, Ibrecht-Nebe H, Grune T. Increased lipid peroxidation in children with autoimmune diseases. *Cta. Paediatr.* 1997; 86:609-612.
72. Selley ML, Bartlett MR, McGuinness JA, Hapel AJ, Ardlie NG. Determination of the lipid peroxidation product trans-4-hydroxi-2-nonenal in biological samples by high performance liquid chromatography and combined capillary column gas chromatography negative ion chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1989; 488:329-340.
73. Strohmainer H, Hinghofer-Szalkay, Schaur R.J. Detection of 4-hydroxinonenal (HNE) as a physiological component in human plasma. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 1995; 11:51-61.
74. Poli G, Schaur R.J, Siems W.G, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med. Res. Rev.* 2008; 28(4): 569-631.
75. Dominguez.Rodriguez A, Abreu-Gonzales P, de la Rosa A, Vargas M, Ferrer J, García M. Role of endogenous interleukin-10 production and lipid peroxidation in patients with acute myocardial infarction treated with primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Int. J. Cardiol.* 2005; 99:77-81
76. Re G, Lanzarini C, Vaona I, Pazzaglia M, Palareti G, Bassein L, Guarnieri C. Systemically circulating oxidative species in human deep venous thrombosis. *Eur. J. Emerg. Med.* 1998; 5:9–12.
77. Roberto Ferrari, G. Guardigli, D. Mele, G. F. Percoco, C. Ceconi, S. Curello. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Current Pharmaceutical Design.* 2004; 10(14):1699-1711.
78. McGorrian C, Yusuf S, Islam S, Jung H, Rangarajan S, Avezum A, Prabhakaran D, Almahmeed W, Rumboldt Z, Budaj A, Dans AL, Gerstein HC,

- Teo K, Anand SS Estimating modifiable coronary heart disease risk in multiple regions of the world: the INTERHEART Modifiable Risk Score. On behalf of the INTERHEART Investigators. *Eur. Heart. J.* 2011; 32(5):581-589.
79. Silva H, Hernandez-Hernandez R, Vinueza R, Velasco M, Boissonnet CP, Escobedo J, Silva HE, Pramparo P, Wilson E; CARMELA Study Investigators. Cardiovascular risk awareness, treatment, and control in urban Latin America. *Am. J. Ther.* 2010; 17(2):159-166.
80. Schargrotsky H, Hernández-Hernández R, Champagne BM, Silva H, Vinueza R, Silva Ayçaguer LC, Touboul PJ, Boissonnet CP, Escobedo J, Pellegrini F, Macchia A, Wilson E; CARMELA Study Investigators. CARMELA: assessment of cardiovascular risk in seven Latin American cities. *Am. J. Med.* 2008; 121(1):58-65.
81. Rodríguez T, Malvezzi M, Chatenoud C, Bosetti C, Levi F, Negri E, et al. Trends in mortality from coronary heart and cerebrovascular disease in the Americas: 1970-2000. *Heart.* 2006; 92: 453-460.
82. Pompella A, Romani A, Fulceri R, Benedetti A, Comporti M. Biochim 4-Hydroxynonenal and other lipid peroxidation products are formed in mouse liver following intoxication with allyl alcohol. *Biophys. Acta.* 1988; 12;961(3):293-298.
83. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990;186:407-421.
84. Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science.* 2008 12;321(5895):1493-1495.
85. Lang J, Celotto C, Esterbauer H. Quantitative determination of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1985; 150(2):369-378.

86. Löwbeer C, Wallinder H. Stability of IMMULITE 2000 plasma NT-proBNP in tubes with separator gel stored at room temperature. *Clin. Chim. Acta.* 2007; 377(1-2):283-284.
87. Bouchard A, Reeves RC, Cranney G, Bishop SP, Pohost GM. Assessment of myocardial infarct size by means of T2-weighted 1H nuclear magnetic resonance imaging. *Am. Heart J.* 1989; 117(2):281-289.
88. Selvester RH, Wagner JO, Rubin HB: Quantitation of myocardial infarct size and location by electrocardiogram and vectorcardiogram. In Boerhave Course in Quantitation in Cardiology, edited by Snellin HA. The Netherlands, Leyden University Press, 1972, p 31.
89. Juergens CP, Fernandes C, Hasche ET, Meikle S, Bautovich G, Currie CA, Freedman SB, Jeremy RW. Electrocardiographic measurement of infarct size after thrombolytic therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; 27(3):617-624.
90. Wagner GS, Freye CJ, Palmeri ST, Roark SF, Stack NC, Ideker RE, Harrell FE Jr, Selvester RH. Evaluation of a QRS scoring system for estimating myocardial infarct size. I. Specificity and observer agreement. *Circulation.* 1982; 65(2):342-347.
91. Eisen HJ, Barzilai B, Jaffe AS, Geltman EM. Relationship of QRS scoring system to enzymatic and pathologic infarct size: the role of infarct location. *Am. Heart J.* 1988; 115(5):993-1001.
92. Chávez L, Esquivel C. G, Reyes J.R, Espinosa R, Aguilar E, Rodríguez V. M. Concordancia de la fracción de expulsión miocárdica por electrocardiograma y ecocardiograma transtorácico. *Medicrit.* 2005; 2(8):155-163.

ANEXOS

Anexo A.1. Curva de calibración realizada con patrón sintético HNE-DNPH

Concentración HNE (μM)	Altura del pico (mAU)
0,1	0,039
0,5	0,1815
1	0,368
2	0,732
5	1,589
10	3,663
15	4,8866
20	6,7514
25	8,7077

