

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante
en el paciente con hipertrofia cardiaca: estudio observacional**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene González del Pozo

Directores

M^a Begoña Quintana Villamandos
Juan Francisco del Cañizo López

Madrid



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Irene González del Pozo
con número de DNI/NIE/Pasaporte 61104087L, estudiante en el Programa
de Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas,
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante en el paciente con hipertrofia cardiaca.
Estudio Observacional.

y dirigida por: Dña. M.ª Begoña Quintana Villamandos y D. Juan Francisco del Cañizo López

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 22 de mayo de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

Programa de Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas

TESIS DOCTORAL

Biomarcadores de estrés oxidativo y
capacidad antioxidante en el paciente con
hipertrofia cardiaca. Estudio observacional.

PRESENTADA POR

Irene González del Pozo

DIRECTORES

Dra. M.^a Begoña Quintana Villamandos

Dr. Juan Francisco del Cañizo López

Madrid, 2019

Dña. María Begoña Quintana Villamandos, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Departamento de Anestesiología y Reanimación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

D. Juan Francisco del Cañizo López, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Departamento de Cirugía del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

CERTIFICAN QUE:

El trabajo titulado: "**Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante en el paciente con hipertrofia cardiaca. Estudio observacional.**", presentado por Dña. Irene González del Pozo, ha sido realizado bajo su dirección y consideran que reúne las condiciones para ser leído y defendido como TESIS DOCTORAL en la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste a efectos académicos, expedimos el presente informe en

Madrid, a 22 de mayo de 2019.



Dña. M.^a Begoña Quintana Villamandos



D. J. Francisco del Cañizo López

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social a través del Fondo de Investigaciones Sanitarias (**FIS P116/02069**) y los Fondos Feder.

Declaración de conflictos de intereses

Ninguno de los participantes tiene conflictos de intereses relacionados con este trabajo de investigación.

A José González Carmona y Almudena del Pozo Sanz.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a numerosas personas y me gustaría mostrar mi agradecimiento expresamente:

- A mis directores de tesis, Begoña Quintana Villamandos y Juan Francisco del Cañizo López, por la confianza depositada en mí, por su ayuda imprescindible para el desarrollo de esta tesis y por ser un ejemplo a seguir como médicos, docentes e investigadores.
- A mis padres, por ser los mejores maestros y los responsables de mis inquietudes y sueños, gracias a los cuales soy quien soy. A mis hermanos, por darme tantos buenos momentos y llenarme la vida.
- A Jaime, por escucharme hablar de investigación y práctica clínica durante horas, por compartir mis preocupaciones y por ayudarme a ver todo con otros ojos.
- A Elena, Jonathan, Nur y Sandra, por enseñarme a relativizar en los malos momentos y ayudarme a ser mejor médico día a día.
- A Alba y Marian, mi familia andaluza, por enriquecerme como persona y darme calor en épocas de frío.
- Por último, a los compañeros que, mediante su colaboración, han hecho posible este proyecto: Emilio Delgado Baeza, Ángel González Pinto, Álvaro Pedraz Prieto y Laia Pazó Sayós.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	7
LISTADO DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN	15
SUMMARY	19
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1 El contexto clínico	24
1.1.1 Definición y prevalencia de la hipertrofia cardiaca	24
1.1.2 Fisiopatología de la hipertrofia cardiaca	25
▪ <i>Tipos de hipertrofia cardiaca</i>	26
▪ <i>Factores en la hipertrofia cardiaca</i>	27
1.1.3 Diagnóstico de la hipertrofia cardiaca	29
▪ <i>Ecocardiografía</i>	31
▪ <i>Resonancia magnética cardiaca</i>	32
▪ <i>Masa del ventrículo izquierdo indexada y grosor parietal relativo</i>	33
1.1.4 Repercusión clínica y pronóstico de la hipertrofia cardiaca	34
1.1.5 Opciones terapéuticas en la actualidad	39
▪ <i>Intervenciones no farmacológicas</i>	39
▪ <i>Intervenciones farmacológicas</i>	40
1.2 Estrés oxidativo y respuesta hipertrófica	44
1.2.1 Definición	44
1.2.2 Daño oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante	45
▪ <i>Radicales libres y especies reactivas</i>	45
▪ <i>Sistemas enzimáticos productores de radicales libres y especies reactivas</i>	46
▪ <i>Dianas biológicas y daño oxidativo</i>	48
▪ <i>Mecanismos de defensa antioxidante</i>	49
1.2.3 Biomarcadores de estrés oxidativo	52
▪ <i>Biomarcadores de peroxidación lipídica</i>	53
▪ <i>Biomarcadores de oxidación de proteínas</i>	54
▪ <i>Biomarcadores de oxidación de ADN</i>	56
▪ <i>Mecanismos enzimáticos y no enzimáticos antioxidantes</i>	57

1.2.4 Estrés oxidativo en la práctica clínica	58
1.3 Indicadores globales de estrés oxidativo: OXY-SCORE.....	60
1.3.1 Definición	60
1.3.2 Utilidad	61
1.4 Justificación del estudio	62
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	64
2.1 Hipótesis	65
2.2 Objetivos.....	65
▪ <i>Objetivo principal</i>	65
▪ <i>Objetivos secundarios</i>	65
2.3 Planteamiento.....	66
3. MATERIAL Y MÉTODOS	68
3.1 Material.....	69
3.1.1 Sujetos del estudio.....	69
3.1.2 Reactivos	69
3.1.3 Equipos	71
3.2 Métodos	72
3.2.1 Consideraciones éticas y legales	72
3.2.2 Diseño del estudio.....	73
▪ <i>Variables del estudio</i>	74
3.2.3 Método de estudio del estrés oxidativo	76
▪ <i>Cuantificación de la capacidad antioxidante plasmática</i>	76
▪ <i>Cuantificación de la actividad oxidante plasmática</i>	82
3.2.4 Determinación del índice de proteínas tioladas y del OXY-SCORE....	84
3.2.5 Diseño estadístico.....	84
▪ <i>Cálculo del tamaño muestral</i>	84
▪ <i>Análisis estadístico</i>	85
▪ <i>Cálculo del OXY-SCORE en la hipertrofia ventricular izquierda</i>	86
4. RESULTADOS.....	88
4.1 Caracterización de los sujetos de estudio	89
4.2 Estudio de las variables bioquímicas.....	93
4.3 Estudio del estatus antioxidante y parámetros de estrés oxidativo..	95

4.3.1	Biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo	95
4.3.2	Biomarcadores plasmáticos de defensa antioxidante	96
4.4	Estudio de nuevos biomarcadores de estrés oxidativo plasmático: Índice de proteínas tioladas	98
4.5	Indicador global de estrés oxidativo en la hipertrofia ventricular izquierda	102
4.5.1	Estandarización de los parámetros originales y normalizados.....	102
4.5.2	Cálculo del indicador global de estrés oxidativo (OXY-SCORE).....	105
5.	DISCUSIÓN	106
5.1	La hipertrofia ventricular izquierda es un problema en la práctica clínica	107
5.2	Los métodos diagnósticos en la hipertrofia ventricular izquierda son insuficientes	109
5.3	Los biomarcadores de estrés oxidativo ofrecen ventajas para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares	111
5.4	El índice de proteínas tioladas: biomarcador plasmático de hipertrofia ventricular izquierda	114
5.5	El OXY-SCORE en la hipertrofia ventricular izquierda: desequilibrio entre los sistemas de defensa antioxidante y daño oxidativo a favor del último	116
5.6	Dónde estamos y perspectivas futuras.....	118
5.7	Limitaciones y fortalezas del estudio.....	119
6.	CONCLUSIONES	122
7.	BIBLIOGRAFÍA	124
8.	ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	151
8.1	Índice de figuras.....	152
8.2	Índice de tablas	154
9.	ANEXOS	156
9.1	Dictamen favorable del Comité Ético de Investigación Clínica	157
9.2	Consentimiento informado del paciente	158
9.3	Publicación asociada al proyecto de investigación.....	164

LISTADO DE ABREVIATURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanina aminotransferasa
ARA II	Antagonistas del receptor de la angiotensina II
ASC	Área de superficie corporal
AUC	Área bajo la curva
BCS	Sal disódica del ácido batocuproinedisulfónico
BSA	Albúmina de suero de bovino
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
CK	Creatinquinasa
Cr	Creatinina
CTA	Coelenteramida
CTZ	Coelenterazina
DL	Dislipemia
DM	Diabetes Mellitus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
DNTB	5,5-ditiobis (2-nitro ácido benzoico)
DS	<i>Damage Score</i>
DTT	Ditioteitrol
DVI_d	Diámetro telediastólico
ECG	Electrocardiografía
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERBr	Especies reactivas del bromo
ERC	Enfermedad renal crónica

ERCI	Especies reactivas del cloro
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
ERO	Especies reactivas del oxígeno
FG	Filtrado glomerular
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
GPR	Grosor parietal relativo
GPx	Glutación peroxidasa
GRed	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
Hb	Hemoglobina
HNE	4-Hidroxi-2-nonenal
HRP	Peroxidasa tipo I de rábano
HTA	Hipertensión arterial
Htco	Hematocrito
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
Hx	Hipoxantina
IAA	Ácido iodoacético
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IPT	Índice de proteínas tioladas
MDA	Malondialdehido
MVlsc	Masa del ventrículo izquierdo indexada por la superficie corporal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida
NEM	N-etilmaleimida
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa

NT-proBNP	Propéptido natriurético cerebral N-terminal
OPT	O-ftalaldehido
PPVId	Grosor pared posterior
PS	<i>Protection Score</i>
RMC	Resonancia magnética cardiaca
RL	Radicales libres
ROC	<i>Receiver Operating Characteristics</i>
RV+	Razón de verosimilitud positiva
RV-	Razón de verosimilitud negativa
SAHOS	Síndrome de apnea hipopnea obstructiva del sueño
SEM	Error estándar de la media
SHR	<i>Spontaneously hipertensive rat</i>
SIVd	Grosor septo interventricular
SOD	Superóxido dismutada
SOSA	<i>Superoxide Anion Scavenging Activity</i>
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TAC	Capacidad antioxidante total
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TTPA	Tiempo de tromboplastina parcial activado
VI	Ventrículo izquierdo
VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo
8-OHdG	8-Hidroxi-2'-deoxiguanosina

RESUMEN

Introducción y Objetivos

La hipertrofia ventricular izquierda (HVI) es un mecanismo de adaptación del corazón frente a diferentes tipos de estrés. La HVI progresa con el tiempo aumentando la incidencia de insuficiencia cardiaca, arritmias malignas, isquemia miocárdica, complicaciones cerebrovasculares y muerte súbita. En la literatura encontramos tratamientos farmacológicos que producen regresión de la HVI, disminuyendo la incidencia de eventos adversos cardiovasculares así como la mortalidad en estos pacientes. Por lo tanto, el diagnóstico y el inicio del tratamiento adecuado son fundamentales.

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, en favor de los primeros, que conduce a una ruptura del control y señalización fisiológica que ejerce el sistema redox. Ha sido implicado en diversas patologías, entre ellas las enfermedades cardiovasculares como la HVI. Los objetivos de un biomarcador de estrés oxidativo son el diagnóstico de una patología así como ser diana terapéutica en la búsqueda de nuevos tratamientos. Se han propuesto numerosos biomarcadores pero ninguno puede ser considerado *gold standard* para medir estrés oxidativo. Recientemente se ha propuesto el uso de un indicador integral que tiene en cuenta la naturaleza multifactorial del estrés oxidativo y que se ha denominado OXY-SCORE.

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar el estado oxidativo del paciente con HVI, diseñando y calculando un indicador integral que tenga en cuenta tanto el daño oxidativo como el sistema de defensa antioxidante.

Material y Métodos

Se ha diseñado un estudio observacional, prospectivo, no aleatorizado, comparativo de dos grupos: pacientes con HVI (grupo HVI, n = 35) y pacientes sin HVI (grupo control, n = 35). Criterios de inclusión: pacientes mayores de 18 años ingresados en la planta de Cirugía Cardiovascular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón pendientes de cirugía programada y cuya historia clínica incluya un estudio ecocardiográfico que indique la existencia o no de hipertrofia ventricular izquierda. Criterios de exclusión: pacientes que no cumplan todos los criterios de inclusión descritos anteriormente y/o no firmen el consentimiento informado. Los pacientes fueron reclutados de forma consecutiva tras ingresar en el hospital y cada paciente fue incluido en el grupo control o en el grupo estudio según el diagnóstico de HVI del estudio ecocardiográfico. En cada paciente se realizó la extracción de una muestra de sangre venosa para la realización del estudio de los marcadores de estrés oxidativo: biomarcadores plasmáticos de defensa antioxidante (capacidad antioxidante total, tioles totales, glutatión reducido, actividad superóxido dismutasa y actividad catalasa) y biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo (carbonilos, malondialdehdo y proteínas tioladas). Las variables anteriormente descritas permitieron el cálculo de los siguientes parámetros:

- Índice de proteínas tioladas (IPT): ratio entre proteínas tioladas/tioles totales. Posteriormente, se estudió la validez y fiabilidad diagnóstica del IPT como nuevo biomarcador de estrés oxidativo en pacientes con HVI.
- OXY-SCORE: indicador global de estrés oxidativo plasmático en la hipertrofia ventricular izquierda.

Resultados

El análisis de los biomarcadores prooxidantes plasmáticos (carbonilos, malondialdehído, proteínas tioladas) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con HVI y los pacientes sin HVI. El análisis de los biomarcadores antioxidantes plasmáticos (capacidad antioxidante total, tioles totales, glutatión reducido, actividad superóxido dismutasa y actividad catalasa) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con HVI y los pacientes sin HVI.

El índice de proteínas tioladas (IPT) presentó una elevación estadísticamente significativa en los pacientes con HVI con respecto a los pacientes sin HVI, con un área bajo la curva ROC de 0.75 (IC 95%, 0.63-0.86; $p < 0.001$), sensibilidad 70.6% y especificidad 68.6%.

El indicador global de estrés oxidativo (OXY-SCORE), calculado a partir de los biomarcadores individuales (carbonilos, malondialdehído, capacidad antioxidante total, tioles totales, glutatión reducido, actividad superóxido dismutasa y actividad catalasa), mostró un predominio del daño oxidativo en los pacientes con HVI con respecto a los pacientes sin HVI.

Conclusiones

El estudio del estado oxidativo del paciente con HVI ha permitido diseñar y calcular un indicador integral que tiene en cuenta tanto el daño oxidativo como el sistema de defensa antioxidante, mostrando un predominio del daño oxidativo. El IPT podría ser un nuevo biomarcador plasmático en el diagnóstico de la HVI.

SUMMARY

Introduction and Objectives

Left ventricular hypertrophy (LVH) is a mechanism of adaptation of the heart to different types of stress. LVH progresses over time increasing the incidence of heart failure, malignant arrhythmias, myocardial ischemia, systolic dysfunction, sudden death, and cerebrovascular complications. In the literature we find pharmacological treatments that produce regression of LVH, decreasing the incidence of cardiovascular adverse events as well as mortality in these patients. Therefore, diagnosis and the initiation of appropriate treatment are essential.

Oxidative stress is defined as a situation of global imbalance between pro-oxidants (harmful) and antioxidants (defense) existing in a biological system, in favor of the former. It has been implicated in various pathologies, including cardiovascular diseases such as ventricular hypertrophy. The objectives of a biomarker of oxidative stress are the diagnosis of the pathology as well as being the therapeutic target in the search for new treatments of said pathology. Many indicators have been proposed but none can be considered as gold standard to measure oxidative stress. Recently, the use of a comprehensive indicator that takes into account the multifactorial nature of oxidative stress has been proposed and has been called OXY-SCORE.

The objective of this study is to analyse the oxidative state of the patient with LVH by designing and calculating an integral indicator that takes into account both oxidative damage and the antioxidant defense system.

Material and Methods

An observational, prospective, non-randomized, comparative study of two groups was designed: patients with LVH (LVH group, n = 35) and patients without LVH (control group, n = 35). Inclusion criteria: patients older than 18 years admitted to the Cardiovascular Surgery Unit of the Gregorio Marañón General University Hospital pending scheduled surgery and whose clinical history includes an echocardiographic study that indicates the existence or not of left ventricular hypertrophy. Exclusion criteria: patients who do not meet all of the inclusion criteria described above and/or do not sign informed consent. The patients were recruited consecutively after entering the hospital and each patient was included in the control group or study group according to the LVH diagnosis of the echocardiographic study. In each patient, a venous blood sample was extracted for the study of oxidative stress markers: plasma antioxidant defense biomarkers (total antioxidant capacity, total thiols, reduced glutathione, superoxide dismutase activity and catalase activity) and plasma biomarkers of oxidative damage (carbonyls, malondialdehyde and thiolated proteins). The previously described variables allowed the calculation of the following parameters:

- Thiolated protein index (TPI): ratio between thiolated proteins/total thiols. Subsequently, the validity and diagnostic reliability of TPI as a new biomarker of oxidative stress in patients with LVH was studied.
- OXY-SCORE: global indicator of plasma oxidative stress in left ventricular hypertrophy.

Results

The analysis of plasma pro-oxidant biomarkers (carbonyls, malondialdehyde, thiolated proteins) showed no statistically significant differences between patients with LVH and patients without LVH. The analysis of plasmatic antioxidant biomarkers (total antioxidant capacity, total thiols, reduced glutathione, superoxide dismutase activity and catalase activity) did not show statistically significant differences between patients with LVH and patients without LVH.

The thiolated protein index (TPI) presented a statistically significant elevation in patients with LVH compared to patients without LVH, with an area under the ROC curve of 0.75 (95% CI, 0.63-0.86, $p < 0.001$), sensitivity 70.6 % and specificity 68.6%.

The global indicator of oxidative stress (OXY-SCORE), calculated from the individual biomarkers (carbonyls, malondialdehyde, total antioxidant capacity, total thiols, reduced glutathione, superoxide dismutase activity and catalase activity), showed a predominance of oxidative damage in patients with LVH with respect to patients without LVH.

Conclusions

The study of the oxidative state of the patient with LVH has allowed the design and calculation of a comprehensive indicator that takes into account both oxidative damage and the antioxidant defense system, showing a predominance of oxidative damage. TPI could be a new plasma biomarker in the diagnosis of LVH.

1

INTRODUCCIÓN

1.1 El contexto clínico

1.1.1 Definición y prevalencia de la hipertrofia cardiaca

La hipertrofia ventricular izquierda (HVI) es un mecanismo de adaptación del corazón frente a diferentes tipos de estrés que se caracteriza por el aumento del grosor de sus paredes. En principio, su finalidad es mantener la tensión de pared debido a que, en virtud de la Ley de Laplace-Young (Figura 1), la tensión parietal es igual al producto de la presión intraventricular por el radio de la cavidad dividido por el doble del espesor de la pared.

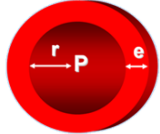
$$\text{Tensión parietal} = \frac{P \times r}{2e}$$


Figura 1. La ley de Laplace-Young establece que la tensión parietal es proporcional de modo directo a la presión transmural (P) y al radio de la cavidad (r) e inversamente proporcional al espesor de la pared (e).

La HVI aparece en distintas formas de patología cardiovascular, entre las que destaca la hipertensión arterial (HTA) y, en un segundo plano, la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardíaca y las valvulopatías cardíacas.

La prevalencia de la HVI en pacientes con HTA varía significativamente en función del método diagnóstico que se utilice¹⁻⁴. En estudios de pacientes hipertensos, la prevalencia de HVI diagnosticada mediante electrocardiografía varía consistentemente (0.6-40%) con un promedio de 18%³. Sin embargo, en pacientes a los que se les realiza un ecocardiograma, la prevalencia varía del 36% (criterios más conservadores) al 41% (criterios menos conservadores)⁴. Se estima que la prevalencia de la HVI puede superar el 90% en pacientes con

HTA grave o maligna sostenida^{5,6} frente al 10% en pacientes con HTA maligna de nueva aparición o preeclampsia^{6,7}.

Algunos estudios han demostrado que, en pacientes hipertensos, la obesidad aumenta la prevalencia de HVI de 1,5 a 2 veces^{8,9}. En otro estudio, Schmieder *et al.*¹⁰, concluyeron que la obesidad *per se* está asociada con una mayor masa del ventrículo izquierdo (VI), particularmente con el patrón excéntrico de HVI. La prevalencia de HVI en formas secundarias de HTA por enfermedad renal o endocrinológica es similar a la HTA esencial^{11,12}.

Otro estudio de Schmieder *et al.*¹³ concluye que, en pacientes con HTA, el consumo de sal en la dieta, la presión arterial y la obesidad han resultado ser determinantes fuertes e independientes de HVI.

Aunque algunos autores apuntan que el sexo masculino influye en la masa del VI¹⁴, Kupari *et al.*¹⁵ encontraron que las diferencias halladas entre ambos sexos desaparecen cuando en el análisis estadístico se incluyen las diferentes características hemodinámicas, de estilo de vida y de laboratorio.

1.1.2 Fisiopatología de la hipertrofia cardiaca

La hipertrofia cardiaca es una respuesta adaptativa que desarrolla el cardiomiocito, caracterizada por el incremento de su tamaño ante un aumento de trabajo al que es expuesto. En una primera fase de compensación, este mecanismo adaptativo permite al corazón ajustar la masa cardiaca a la carga hemodinámica y normalizar el consumo de oxígeno¹⁶. Aunque inicialmente se consigue normalizar el estrés parietal, los cambios de los componentes del miocardio no son balanceados y finalmente se desemboca en una segunda fase de descompensación. En esta segunda fase, existe una desigualdad patológica entre cardiomiocitos y matriz extracelular. Además, la

microcirculación coronaria no aumenta de forma proporcional a la hipertrofia celular, produciéndose fenómenos de isquemia-reperusión y apoptosis de cardiomiocitos. Los cambios en el metabolismo extracelular y la fibrosis pueden ser los factores que establezcan la diferencia entre la fase compensadora y la HVI patológica¹⁷. En el caso de la cardiopatía hipertensiva, la intensidad de la fibrosis ha sido relacionada con disfunción diastólica¹⁸ y sistólica¹⁹, disminución de la reserva coronaria²⁰ y arritmias ventriculares¹⁹.

- ***Tipos de hipertrofia cardiaca***

Las características del estímulo que modifica la carga de trabajo del VI son importantes ya que modulan el tipo de respuesta estructural (Figura 2). Se han descrito dos tipos de estímulos: la postcarga o sobrecarga de presión, reflejada en el estrés parietal fundamentalmente sistólico, y la precarga o sobrecarga de volumen, representada en el estrés parietal fundamentalmente diastólico¹⁶. Todo ello condiciona que existan dos tipos de HVI:

- HVI concéntrica: el estímulo es una sobrecarga de presión y produce un crecimiento del cardiomiocito en su anchura. Su prevalencia en pacientes con HTA diagnosticada por ecocardiografía oscila entre 17.3-19.3%⁴.
- HVI excéntrica: el estímulo es una sobrecarga de volumen y tendremos un crecimiento del cardiomiocito en longitud. Su prevalencia en pacientes con HTA diagnosticada por ecocardiografía oscila entre 23.7-27.1%⁴.

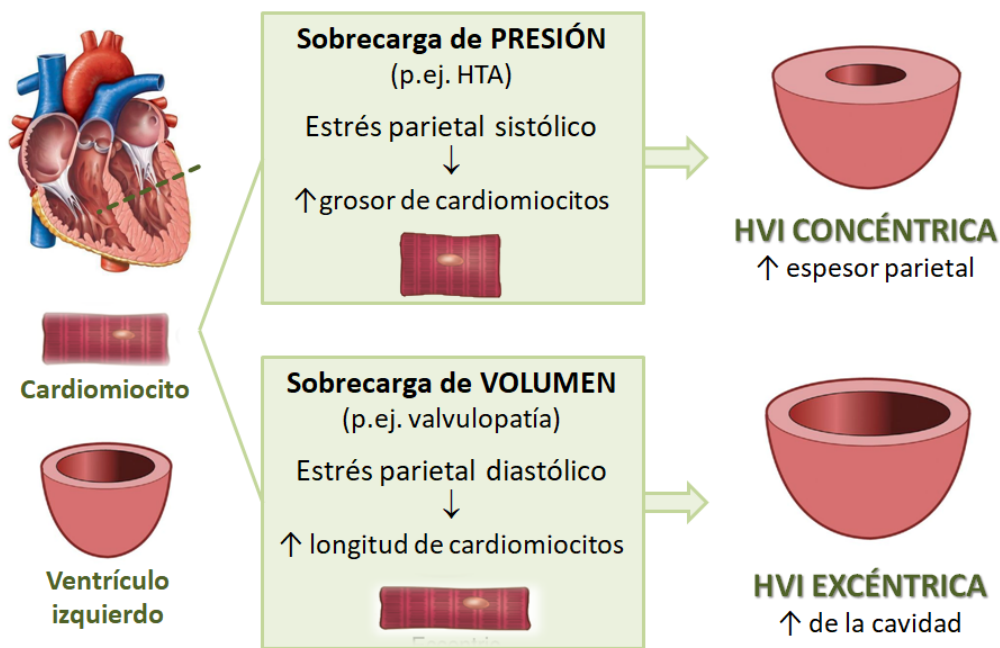


Figura 2. Esquema de los principales patrones de hipertrofia ventricular izquierda según el tipo de estímulo. La sobrecarga de presión produce un aumento del tamaño de los cardiomiocitos predominantemente en el grosor, dando lugar a una HVI concéntrica. La sobrecarga de volumen produce un aumento del tamaño de los cardiomiocitos predominantemente en longitud, originando una HVI excéntrica.

▪ Factores en la hipertrofia cardíaca

Los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la HVI han sido objeto de numerosos estudios centrados en tres factores principales:

- ⇒ Factores hemodinámicos
- ⇒ Factores genéticos
- ⇒ Factores neuroendocrinos: activación del sistema nervioso simpático y regulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).

Los factores hemodinámicos incluyen el aumento de la presión arterial, el estrés de la pared, la precarga y la rigidez arterial. La masa del VI y el grosor relativo de la pared están más relacionados con la presión arterial ambulatoria de 24 horas que con la presión arterial puntual²¹⁻²³. La masa del VI se ha relacionado más estrechamente con la presión arterial sistólica que con la

diastólica^{21,24,25}. La rigidez de las arterias de gran calibre aumenta la velocidad de la onda de pulso²⁴⁻²⁷ y la viscosidad sanguínea^{28,29}, constituyendo nuevos factores hemodinámicos que pueden modificar la HVI en pacientes con HTA.

Los factores genéticos son aquellos responsables de que el desarrollo de la HVI no sea igual en individuos que comparten alteraciones hemodinámicas y neuroendocrinas. Ravogli *et al.*²³ encontraron una mayor masa del VI en personas normotensas descendientes de padres hipertensos. Otros estudios que hablan de un posible factor genético incluyen estudios de gemelos^{30,31} y estudios que comparan a pacientes hipertensos de raza blanca y negra. Estos últimos concluyen que la mayor incidencia de HVI encontrada en pacientes de raza negra es paralela a la mayor frecuencia y gravedad de HTA en la raza negra^{32,33}, lo que sugiere que la raza *per se* no es un factor determinante de la HVI.

Por último, sobre los factores neuroendocrinos, la evidencia se centra en la activación del sistema nervioso simpático y la regulación del SRAA. Algunos autores han desarrollado experimentos en los que la administración de catecolaminas *in vivo* indujo HVI^{34,35}. Sin embargo, en otro estudio la administración *in vitro* no indujo hipertrofia de células miocárdicas adultas³⁶. Esto sugiere que es imprescindible un aumento de la actividad del sistema nervioso simpático central a nivel neurogénico para producir HVI, siendo necesarios más estudios para dilucidar los factores que contribuyen a ello. Sobre el SRAA, existe evidencia sobre los efectos cardiotróficos de la angiotensina II en cultivos celulares y modelos animales^{37,38}, así como su relación con el espesor de la pared del VI o la masa del VI en seres humanos^{39,40}. En definitiva, existe evidencia de que la supresión inadecuada de

la angiotensina II o la hiperrespuesta a la angiotensina II modulan cambios estructurales del VI. La aldosterona también ha sido señalada como responsable en los cambios en la adaptación del VI ante un aumento de presión. Se ha descrito que niveles elevados de aldosterona inducen una respuesta del tejido fibroso en ambos ventrículos^{41,42}, así como un aumento de masa del VI y una disminución de la función sistólica del VI en pacientes hipertensos⁴³. Por lo tanto, el SRAA influye tanto en el remodelado estructural como en el funcionamiento cardíaco.

1.1.3 Diagnóstico de la hipertrofia cardíaca

Actualmente tenemos numerosas herramientas para evaluar la HVI con diferente coste, disponibilidad, sensibilidad y especificidad (Tabla 1).

Tabla 1. Principales características de los métodos diagnósticos de la hipertrofia ventricular izquierda.

	Ventajas	Inconvenientes
ECG	Alta disponibilidad Bajo coste	Baja sensibilidad Múltiples criterios diagnósticos
NT-proBNP	Alta disponibilidad Bajo coste	Escasa evidencia No validado
Ecocardiograma	Alta sensibilidad Alta especificidad	Limitado por ventana acústica y equipos técnicos Reproducibilidad
RMC	Alta sensibilidad Alta especificidad Precisión elevada Reproducible	Coste elevado Interferencia respiración Riesgo en pacientes con dispositivos ferromagnéticos o claustrofóbicos

ECG: electrocardiografía; NT-proBNP: péptido natriurético cerebral N-terminal; RMC: resonancia magnética cardíaca.

En la práctica clínica, la electrocardiografía (ECG) es el procedimiento más utilizado, a pesar de su baja sensibilidad, por ser fácil de realizar, estar ampliamente disponible y ser de bajo coste. Disponemos de numerosos criterios para el diagnóstico de la HVI (Tabla 2), cada uno con distinta

Tabla 2. Principales criterios diagnósticos de hipertrofia ventricular izquierda por electrocardiografía

Criterios de Cornell (voltaje)	Varones: S en V3 + R en aVL > 28 mm Mujeres: S en V3 + R en aVL > 20 mm
Criterios de Cornell (producto de voltaje)	S en V3 + R en aVL (+8 en mujeres) x duración del QRS ≥ 2440 mm x ms
Criterios de Sokolow-Lyon (voltaje)	S en V1 + R en V5 o V6 > 3,5 mV R en aVL > 1,1 mV
Criterios de Romhilt-Estes (sistema de puntuación)	Puntuación ≥ 5 diagnóstica HVI Puntuación = 4 hace "probable" la HVI - <u>Criterios de voltaje (3 puntos):</u> Amplitud de S o R en la derivación de las extremidades ≥ 20 mm, S en V1 o V2 ≥ 30 mm, R en V5 o V6 ≥ 30 mm, o cambios en ST-T. - <u>Alteraciones de la aurícula izquierda (3 puntos):</u> Negativización terminal de P en V1 ≥ 1 mm y ≥ 0.04 s. - <u>Desviación del eje a la izquierda (2 puntos):</u> Eje QRS de -30° o más. - <u>Prolongación del QRS (1 punto):</u> Duración de QRS ≥ 0.09 s - <u>Deflexión intrínseca en V5 o V6 (1 punto):</u> ≥ 0.05 s en V5 o V6

sensibilidad y especificidad⁴⁴. La sensibilidad del ECG oscila entre el 7% y el 35% para la HVI leve y entre el 30% y el 60% para la HVI moderada-grave. En pacientes con HVI grave, la especificidad del ECG es elevada (80-90%)⁴⁵.

Andrade *et al.*⁴⁶ analizaron la utilidad del péptido natriurético cerebral N-terminal (NT-proBNP) en la identificación de la HVI frente al ECG mediante los criterios clásicos de Cornell y/o Sokolow-Lyon. Estos autores defienden el uso del NT-proBNP en la selección de los pacientes candidatos a la realización de un estudio ecocardiográfico. Sin embargo, otros estudios son contradictorios y no han encontrado evidencia suficiente para recomendar el NT-proBNP en el cribado de HVI^{47,48}.

En cuanto a las pruebas de imagen, la ecocardiografía y la resonancia magnética cardíaca (RMC) son las más utilizadas para evaluar la HVI.

- **Ecocardiografía**

El método más utilizado para evaluar la masa del VI es mediante el modo M, aunque también disponemos de la ecocardiografía bidimensional (2D) y tridimensional (3D). Todas las mediciones deben realizarse al final de la diástole (antes del cierre de la válvula mitral o la fase del ciclo cardíaco en el que el volumen del ventrículo es mayor). Usando el modo M o la ecocardiografía 2D dependemos de fórmulas geométricas para calcular el volumen del miocardio del VI, asumiendo de esta manera que el VI es un elipsoide con una relación eje largo/corto 2:1 y distribución simétrica de la hipertrofia (Figura 3). Esto puede conducir a errores en caso de que exista una distorsión de la forma del ventrículo izquierdo. Sin embargo, la ecocardiografía 3D puede medir el volumen del VI directamente. Finalmente, se convierte el volumen en masa multiplicando el volumen de miocardio por la densidad del miocardio (aproximadamente 1,05 g/ml)⁴⁹.

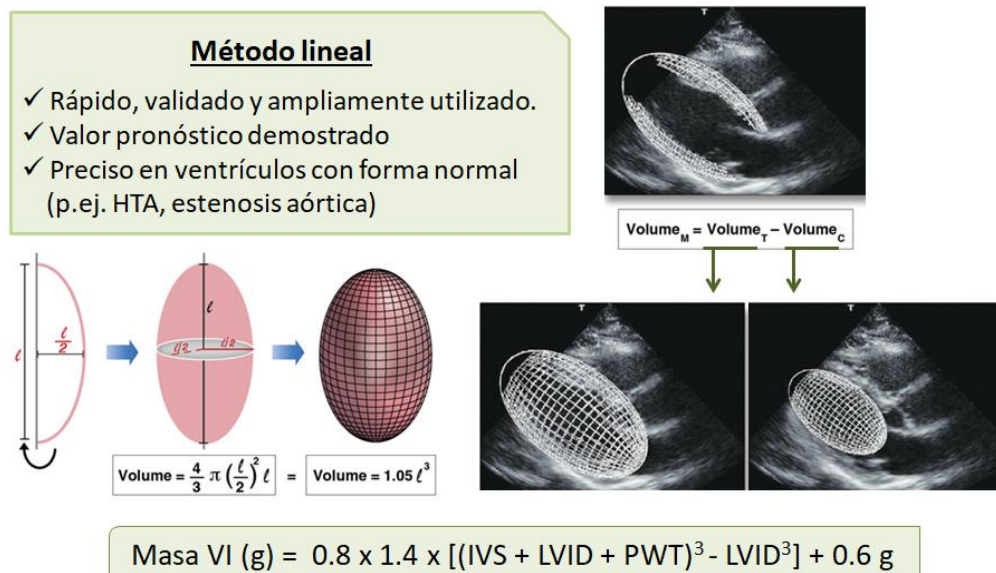


Figura 3. Cálculo de la masa del ventrículo izquierdo según el método lineal (adaptado de Lang *et al.*⁴⁹ y Armstrong *et al.*⁵⁰). IVS: septo interventricular; LVID: diámetro interno del ventrículo izquierdo; PWT: espesor de pared inferolateral.

Las principales limitaciones de esta técnica son la ventana acústica y la experiencia de la persona que realiza la prueba. Es fundamental la correcta identificación de las interfases sangre-endocardio y epicardio-pericardio⁵⁰. La ecocardiografía 3D mejora la precisión y la reproducibilidad, pero depende mucho de los equipos, las condiciones técnicas y la calidad de la ventana acústica^{51,52}.

La ecocardiografía es una prueba de imagen menos costosa que la RMC y en la práctica tiene versatilidad, aceptabilidad y disponibilidad superiores a la RMC. Por ello, sigue siendo de elección en la clínica y así lo respalda la American Heart Association en su última declaración sobre la evaluación de riesgo cardiovascular⁵³.

- ***Resonancia magnética cardiaca***

La RMC proporciona un conjunto de datos tridimensionales definidos en múltiples niveles por lo que no precisa fórmulas geométricas para calcular el volumen del miocárdico. Por convención, la masa del VI se mide al final de la diástole y, al igual que en la ecocardiografía, es el producto del volumen y la densidad del miocardio. La RMC es un método más preciso, más reproducible y presenta menos variabilidad que el modo M y la ecocardiografía 2D^{54,55}. Esta precisión y reproducibilidad tiene implicaciones importantes en el campo de la investigación ya que se pueden usar tamaños de muestra más pequeños para detectar diferencias en la masa del VI. Así mismo, usando un mismo tamaño de muestra se pueden identificar cambios o diferencias más pequeñas⁴⁵.

Sin embargo, la RMC presenta limitaciones no despreciables en la práctica clínica como el coste elevado, el empleo de mayor tiempo para adquirir y analizar datos, la interferencia con la respiración, los riesgos asociados a pacientes portadores de dispositivos ferromagnéticos e incompatibilidad en pacientes

claustrofóbicos. Por ello, las directrices de las sociedades científicas limitan las indicaciones de esta técnica a situaciones clínicas específicas⁵⁶.

- **Masa del ventrículo izquierdo indexada y grosor parietal relativo**

La ecocardiografía y la RMC son las técnicas de imagen más utilizadas para evaluar la masa del miocardio. La cuantificación exacta de las dimensiones cardíacas es fundamental para separar la normalidad de los estados patológicos⁵⁷. El tamaño del corazón aumenta con el tamaño del cuerpo. Se han sugerido varios métodos para indexar la masa del VI a medidas antropométricas, generalmente basadas en la altura y/o el peso. Actualmente, se recomienda que las mediciones de la cámara cardíaca sean indexadas al área de superficie corporal (ASC)⁴⁹.

El aumento de la masa de VI es la expresión más importante de la remodelación cardíaca y está directamente relacionado con complicaciones cardiovasculares. Sin embargo, se desconoce el punto exacto en el que el aumento de masa miocárdica deja de ser un proceso adaptativo y se convierte en un estado patológico. Las últimas Guías de Práctica Clínica de la *American Society of Echocardiography* y la *European Association of Cardiovascular Imaging* establecen los límites de referencia de la masa normal del VI mediante mediciones lineales (modo M) en 95 g/m² en mujeres y 115 g/m² en hombres. Los límites de referencia de la masa normal del VI mediante ecocardiografía 2D son 88 g/m² en mujeres y 102 g/m² en hombres (Tabla 3). En cuando a la ecocardiografía 3D se han publicado en la literatura límites de masa del VI, pero son insuficientes para recomendar valores de referencia⁴⁹.

Tabla 3. Rangos normales y de gravedad para la masa del ventrículo izquierdo (adaptado de Lang *et al.*⁴⁹).

	Mujer				Hombre			
	Normal	HVI leve	HVI moderada	HVI grave	Normal	HVI leve	HVI moderada	HVI grave
Método lineal								
Masa VI (g)	67-162	163-186	187-210	>210	88-224	225-258	259-292	>292
Masa VI/ASC (g/m ²)	43-95	96-108	109-121	>121	49-115	116-131	132-148	>148
Método 2D								
Masa VI (g)	66-150	151-171	172-193	>193	96-200	201-227	228-254	>254
Masa VI/ASC (g/m ²)	44-88	89-100	101-112	>112	50-102	103-116	117-130	>130

HVI: hipertrofia ventricular izquierda; VI: ventrículo izquierdo; ASC: área de superficie corporal.

Además de la masa de VI, el cálculo del grosor parietal relativo (GPR) (Figura 4) permite relacionar el tamaño de la pared posterior y el del VI. Este parámetro nos permite etiquetar un aumento de la masa del VI como concéntrico (GPR>0.42) o excéntrico (GPR≤0.42). Si la masa del VI es normal y GPR está aumentado podemos hablar de remodelado concéntrico (Figura 5).

$$\text{Grosor parietal relativo} = \frac{2 \times \text{Espesor de pared posterior}}{\text{Diámetro interno del VI al final de la diástole}}$$

Figura 4. Fórmula del grosor parietal relativo o cociente de masa respecto a volumen.

1.1.4 Repercusión clínica y pronóstico de la hipertrofia cardiaca

Las últimas guías de práctica clínica de sociedades americanas como la *American Heart Association* reconocen que la HVI es un daño de órgano diana que influye en el pronóstico de los pacientes hipertensos. Sin embargo, los algoritmos de tratamiento de la hipertensión siguen sin incorporar la HVI o la masa del VI en la toma de decisiones en la práctica clínica⁵⁸.

Desde una perspectiva más amplia, la HVI ha demostrado ser un factor de riesgo de morbimortalidad cardiovascular fuerte e independiente de la presión

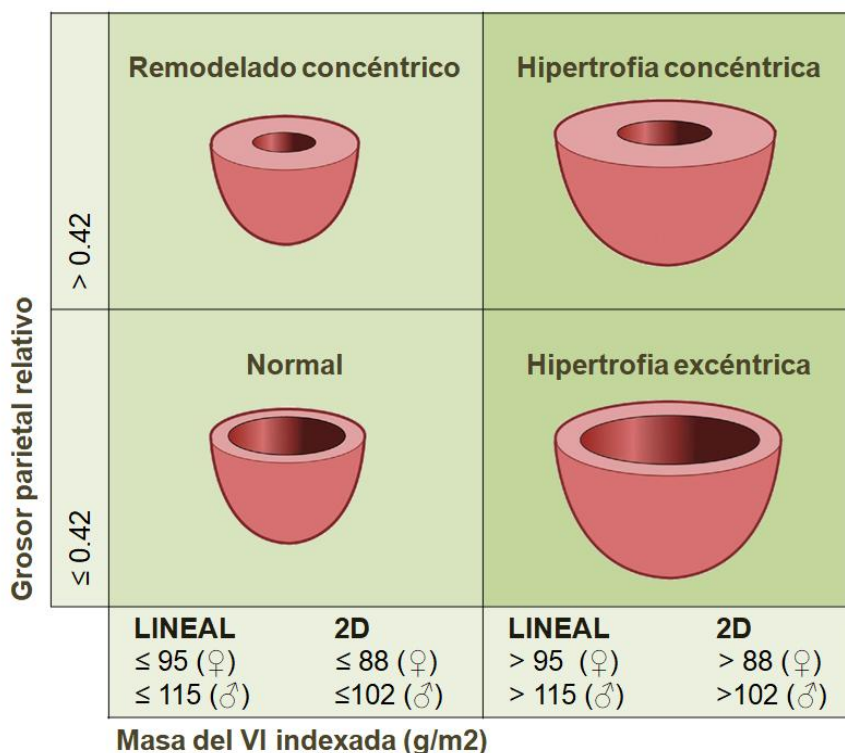


Figura 5. Patrones de geometría ventricular en función de la masa del ventrículo izquierdo indexada y el grosor parietal relativo (adaptado de Lang *et al.*⁴⁹).

arterial. Levy *et al.*⁵⁹ realizaron un análisis del *Framingham Heart Study* afirmando que la masa del VI es un predictor de muerte por cualquier causa, muerte de causa cardíaca y patología coronaria en adultos mayores de 40 años. Por otra parte, Koren *et al.*⁶⁰ realizaron un seguimiento durante 10 años a pacientes con HTA esencial e HVI y a pacientes con HTA esencial sin HVI, hallando una incidencia más alta de eventos cardiovasculares en el primer grupo. En un estudio de Cooper *et al.*⁶¹ la masa del VI destacó como factor pronóstico independiente de la fracción de eyección y de la patología coronaria, siendo el espesor del tabique ventricular y la pared posterior los factores más predictivos de mal pronóstico. La tasa de supervivencia es menor en pacientes con enfermedad coronaria e HVI en comparación con aquellos sin HVI⁶². Verdecchia *et al.*⁶³ publican que, en pacientes aparentemente sanos con hipertensión esencial, la HVI diagnosticada por ECG o ecocardiografía supone

un riesgo de accidentes cerebrovasculares y ataques isquémicos transitorios independientemente de la presión arterial y otros factores de riesgo individuales. Más recientemente, Bang *et al.*⁶⁴ describen cómo la HVI diagnosticada por ECG se asocia con un aumento de la morbilidad cardiovascular y la mortalidad en pacientes con HTA, independientemente del tipo de tratamiento antihipertensivo y de los factores de riesgo cardiovascular.

Cabe pensar que la masa del VI refleja de forma integral las consecuencias del aumento de carga hemodinámica y la fisiopatología cardíaca de forma que la hipertrofia predispone a sufrir complicaciones cardiovasculares.

El pronóstico de nuestros pacientes puede ser distinto si la hipertrofia cardíaca es concéntrica o excéntrica. En personas con HTA primaria, se ha descrito que los pacientes hipertensos con HVI concéntrica presentan una mayor incidencia de eventos cardiovasculares que los pacientes hipertensos con HVI excéntrica^{60,65}. Siguiendo esta misma línea, se ha descrito que en pacientes ancianos con HTA e HVI concéntrica la incidencia de eventos coronarios es mayor que en aquellos con HTA e HVI excéntrica⁶⁶. En consecuencia, tanto el aumento de la masa del VI como la geometría del mismo son de gran importancia para el pronóstico cardiovascular en pacientes hipertensos.

La evidencia no se limita al aumento de masa del VI y crecen los estudios sobre las repercusiones de la reversión de la HVI. Varios estudios prospectivos señalan que esta reversión es determinante en la reducción del aumento de riesgo cardiovascular de los pacientes⁶⁷⁻⁷⁰. Yurenev *et al.*⁶⁷ concluyen que, en pacientes en tratamiento antihipertensivo, la ausencia de disminución de la masa del VI se asoció con una mayor incidencia de eventos adversos. En otro

estudio, Muiasan *et al.*⁶⁸ observaron que la regresión de la HVI se asoció a una reducción de eventos cardiovasculares y que los pacientes en tratamiento antihipertensivo que no presentaban reducción o incluso presentaban aumento de la HVI estaban sujetos a un peor pronóstico. En esta misma línea, Verdecchia *et al.*⁶⁹ encontraron que una reducción en la masa del VI durante el tratamiento antihipertensivo es un marcador pronóstico favorable que predice un menor riesgo de eventos adversos cardiovasculares. Esta asociación fue independiente de la masa del VI basal, de la presión arterial basal y del grado de reducción de la presión arterial. Más recientemente, Koren *et al.*⁷⁰ describen que la reducción de la masa del VI durante el tratamiento antihipertensivo se asocia con una disminución de las complicaciones asociadas a la HTA. Adicionalmente, sugieren que el desarrollo de HVI o la regresión de la HVI durante el tratamiento antihipertensivo pueden estar más estrechamente relacionados con el pronóstico que los cambios en la presión arterial.

En esta última línea, existe evidencia creciente de que la regresión de la HVI electrocardiográficamente^{71,72} o ecocardiográficamente⁷³ está asociada con una disminución de la morbilidad y la mortalidad independientemente de otros factores de riesgo. Esto ha sido respaldado por el ensayo HOPE (*Heart Outcomes Prevention Evaluation*)⁷¹ que concluyó que la regresión de la HVI en ECG es independiente a la reducción de la presión arterial y estos cambios se asociaron con un menor riesgo de muerte, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular e insuficiencia cardíaca congestiva. En el estudio LIFE (*Losartan Intervention For Endpoint Reduction in Hypertension*)⁷³⁻⁷⁵ se incluyeron 9193 pacientes con HVI por ECG, de los cuales se seleccionaron 941 para medir su masa del VI por ecocardiografía. La regresión de la HVI

tanto por ECG como por criterios ecocardiográficos se correlacionó significativamente con la reducción en la incidencia de muerte cardiovascular, infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares. Esta correlación fue independiente del tipo de tratamiento antihipertensivo (atenolol o losartan) y de la reducción de la presión arterial.

Otros estudios han demostrado que la regresión de HVI se asocia con un número reducido de latidos prematuros ventriculares⁷⁶, disminución de la vulnerabilidad a la fibrilación ventricular inducible⁷⁷ y una menor hospitalización por insuficiencia cardíaca en pacientes hipertensos⁷⁸.

En 2010, Pierdomenico *et al.*⁷⁹ presenta su metanálisis sobre la reducción del riesgo cardiovascular en pacientes hipertensos con HVI, comparando la regresión ecocardiográfica de la HVI con la persistencia de HVI/desarrollo de HVI. Los resultados muestran que la regresión ecocardiográfica de la HVI en pacientes con HTA se asocia con una reducción de eventos cardiovasculares.

La regresión de la HVI podría reducir el riesgo de eventos cardiovasculares al mejorar la reserva de flujo coronario, reducir la incidencia de arritmias cardíacas y revertir la disfunción sistólica y diastólica. La HVI podría ser un marcador de exposición prolongada a factores no hemodinámicos implicados en procesos aterogénicos. Por ello, la regresión de la HVI podría asociarse a una disminución de estos factores y una menor progresión o regresión de la aterosclerosis, lo que explicaría la disminución de los eventos no solo cardíacos sino también cerebrovasculares. Por ello, la HVI es un daño de órgano que debemos diagnosticar en pacientes hipertensos⁸⁰. Así mismo, la regresión de la HVI debe ser un objetivo a perseguir y que debemos monitorizar en nuestros pacientes (Tabla 4).

Tabla 4. Sensibilidad para detectar cambios inducidos por el tratamiento, tiempo de cambio y valor pronóstico del cambio (adaptado de Mancía *et al.*⁸⁰).

	Sensibilidad para detectar cambios	Tiempo hasta observar cambios	Implicaciones pronósticas
ECG	Baja	Moderada (> 6 meses)	Si
Ecocardiograma	Moderada	Moderada (> 6 meses)	Si
RMC	Elevada	Moderada (> 6 meses)	Ausencia de estudios

ECG: electrocardiografía; RMC: resonancia magnética cardíaca.

1.1.5 Opciones terapéuticas en la actualidad

La respuesta del corazón ante los estímulos que modifican la carga de trabajo del VI depende de diversos factores hemodinámicos y no hemodinámicos que contribuyen al aumento de masa del VI. La HVI aparece en distintas formas de patología cardiovascular, entre las que destaca la HTA.

Por ello, es razonable pensar que los pacientes hipertensos se puedan beneficiar de múltiples intervenciones y de varios agentes antihipertensivos que actúen en diferentes frentes del proceso de adaptación cardíaca (Figura 6).

▪ **Intervenciones no farmacológicas**

Se ha demostrado que varias intervenciones no farmacológicas reducen la presión arterial y con ello el aumento de carga de trabajo del VI.

Varios estudios de MacMahon *et al.*^{81,82} demuestran que la pérdida de peso en pacientes obesos hipertensos disminuye la presión arterial y se asocia con una reducción de la masa del VI independientemente de los cambios en la presión arterial. En un subgrupo de pacientes con obesidad leve e hipertensión, estos autores observaron que se produce una mayor disminución en la masa del VI por la pérdida de peso que por el tratamiento con β -bloqueantes.

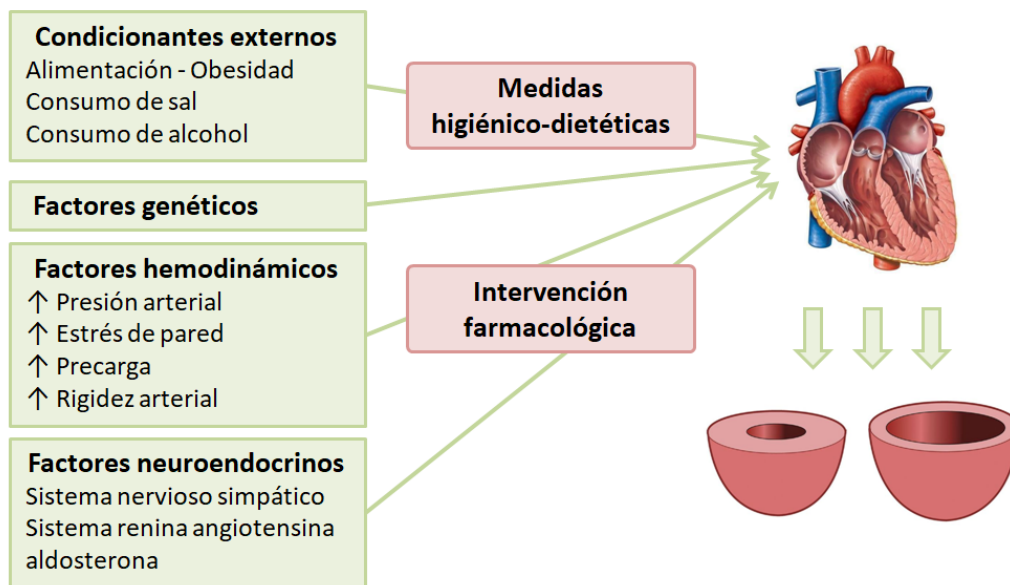


Figura 6. Abordaje de la hipertrofia ventricular izquierda mediante intervenciones no farmacológicas y farmacológicas.

El estudio prospectivo TOMHS (*The Treatment of Mild Hypertension Study*)⁸³ concluye que, en la hipertensión leve, la reducción del peso y la limitación del consumo de sal son tan efectivas para disminuir la masa del VI como la combinación de medidas higiénico-dietéticas con dosis bajas de monoterapia antihipertensiva.

Un análisis de la cohorte del *Framingham Heart Study* sobre la ingesta de alcohol y la masa del VI determina que el consumo de alcohol se asocia de forma independiente con la masa del VI⁸⁴. A falta de estudios prospectivos, la restricción del consumo de alcohol debe incorporarse a las medidas higiénico-dietéticas encaminadas a reducir la hipertrofia.

- **Intervenciones farmacológicas**

Se han publicado numerosos metanálisis que analizan la capacidad de distintos fármacos antihipertensivos en la reversión de la HVI. Los ensayos clínicos, a diferencia de los metanálisis, obtienen con mayor facilidad resultados que sostienen qué agente antihipertensivo tiene mayor efecto sobre

la reducción de la HVI. Sin embargo, el metanálisis es de utilidad debido a que aumenta el poder estadístico, resuelve dudas cuando difieren los resultados entre estudios y mejora la estimación de la magnitud del efecto. No obstante, las principales desventajas son el sesgo de publicación y la heterogeneidad de los estudios, por lo que los resultados deben interpretarse con precaución.

En 1992, Cruickshank *et al.*⁸⁵ presentan el primer metanálisis con 104 estudios y 2107 pacientes, analizando la reversión de la HVI mediante ecocardiografía en pacientes tratados de cuatro formas distintas: terapia de combinación, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), β -bloqueantes y antagonistas del calcio (principalmente dihidropiridinas). Los resultados de todos los tratamientos farmacológicos difirieron significativamente del placebo, lo que sugiere un efecto global del tratamiento antihipertensivo sobre la reducción de la masa del VI. Las dos primeras terapias fueron significativamente más efectivas que las dos últimas en la disminución de la masa del VI, independientemente de la duración del tratamiento y del grado de disminución de la presión arterial.

En ese mismo año, Dahlöf *et al.*⁸⁶ reunieron 109 estudios y 2357 pacientes que sugerían que el tratamiento antihipertensivo es eficaz para reducir la masa del VI con una reducción en paralelo de la presión arterial media. De las diferentes clases de fármacos, este metaanálisis muestra que los IECA, los β -bloqueantes y los antagonistas del calcio reducen la masa del VI disminuyendo el grosor de la pared, siendo este efecto más pronunciado con los IECA. Sin embargo, los diuréticos reducen la masa del VI principalmente a través de una disminución en el diámetro del ventrículo izquierdo.

En 1996, Schmieder *et al.*⁸⁷ incluyeron exclusivamente ensayos clínicos controlados, aleatorizados, doble ciego y con diseño de grupos en paralelo. De 471 estudios hallados en la literatura, únicamente 39 ensayos clínicos cumplían sus criterios de inclusión. En este primer metanálisis, la disminución de la presión arterial, la duración del tratamiento farmacológico y la clase de fármacos surgieron como factores independientes para la reducción de la masa del VI. Los IECA parecían ser más potentes que los β -bloqueantes y los diuréticos en la reducción de la masa del ventrículo izquierdo, no encontrándose diferencias significativas entre IECA y antagonistas del calcio. Dos años más tarde, estos autores publican una actualización añadiendo 11 nuevos estudios⁸⁸. Los resultados reiteraron la superioridad de los IECA y antagonistas del calcio frente a los β -bloqueantes y diuréticos en la reducción de la masa del VI.

En 1998, Jennings y Wong⁸⁹ realizan otra revisión en la que, pese a que la calidad de los estudios había mejorado, seguían destacando la existencia de tamaños muestrales pequeños y diseños de calidad mejorable. La clasificación general según los efectos de cada tratamiento, de mayor a menor, sobre la regresión de la HVI fue: antagonistas del calcio, IECA, diuréticos, alfabloqueantes, β -bloqueantes y cambios en el estilo de vida.

En 2003, Klingbeil *et al.*⁹⁰ presentan una nueva revisión con 80 ensayos clínicos controlados, aleatorizados y doble ciego. En ella se describe una diferencia significativa en la disminución de la masa del VI entre las clases de fármacos antihipertensivos. En orden decreciente, se concluye que la clasificación según los efectos fue: antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA II), antagonistas del calcio, IECA, diuréticos y β -bloqueantes.

En 2009, Fagard *et al.*⁹¹ publican un nuevo metanálisis en el que incluyen 75 publicaciones y realizan comparaciones por parejas de las clases de fármacos antihipertensivos. Concluyen que la regresión de la masa del VI fue significativamente menor con β -bloqueantes que con ARA II, pero el resto de comparaciones por parejas no revelaron diferencias significativas.

Aunque sus conclusiones presentan algunas diferencias, todos los metanálisis coinciden en que la regresión de la HVI es mayor con IECA/ARA II y menor con β -bloqueantes. Sobre esta base, surgen las recomendaciones del documento de consenso de expertos sobre la HTA que aconsejan el uso de IECA o ARA II en pacientes hipertensos con HVI⁹². Sin embargo, la mayoría de estudios que analizaban la regresión de la HVI se realizaron con atenolol como tratamiento de primera línea, no con β -bloqueantes β_1 -selectivos (metoprolol, bisoprolol, nebivolol, esmolol).

Estudios recientes experimentales^{93,94} y clínicos⁹⁵ sugieren que los β -bloqueantes β_1 -selectivos reducen la masa del VI y podrían tener mayor efecto que otros agentes antihipertensivos. En 2017, partiendo de esta hipótesis, Xing *et al.*⁹⁶ publican un metanálisis cuyo objetivo es comparar la eficacia de los β -bloqueantes β_1 -selectivos con cuatro fármacos antihipertensivos en la regresión de la HVI. Se incluyeron un total de 41 ensayos controlados, aleatorizados, y fueron analizados por primera y única vez mediante el método bayesiano. Se estimó que los β -bloqueantes β_1 -selectivos tenían un 72% de posibilidades de ser mejores para la regresión de la HVI, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los β -bloqueantes β_1 -selectivos y los IECA/ARA II. La evidencia clínica fue insuficiente considerando el limitado número de estudios.

En resumen, se necesitan más estudios con β -bloqueantes β_1 -selectivos para descubrir si reducen la masa del VI en mayor medida que otros agentes antihipertensivos. Así mismo, se necesitan estudios que determinen cuál es el impacto de las capacidades de regresión de la HVI de β -bloqueantes β_1 -selectivos, IECA o ARA II sobre el pronóstico de los pacientes.

1.2 Estrés oxidativo y respuesta hipertrófica

1.2.1 Definición

El concepto de estrés oxidativo fue definido en 1985 por Helmut Sies como la condición de desequilibrio global de un sistema biológico existente entre la acción de prooxidantes y la acción de sistemas de defensa antioxidantes prevaleciendo la acción de los primeros⁹⁷ (Figura 7). Sin embargo, desde entonces han surgido nuevas evidencias que apuntan a que, en condiciones fisiológicas normales, los prooxidantes o especies reactivas actúan como moléculas de señalización, por lo que no son moléculas exclusivamente tóxicas. Además, los eventos de señalización y control individuales ocurren a través de vías redox discretas y no responden directamente a un equilibrio global entre prooxidantes y sistemas de defensa antioxidantes. Debido a estas evidencias científicas, Dean P. Jones redefinió en 2006 el estrés oxidativo como el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, en favor de los primeros, que conduce a una ruptura del control y señalización fisiológica que normalmente ejerce el sistema redox, conduciendo a un daño molecular⁹⁸.

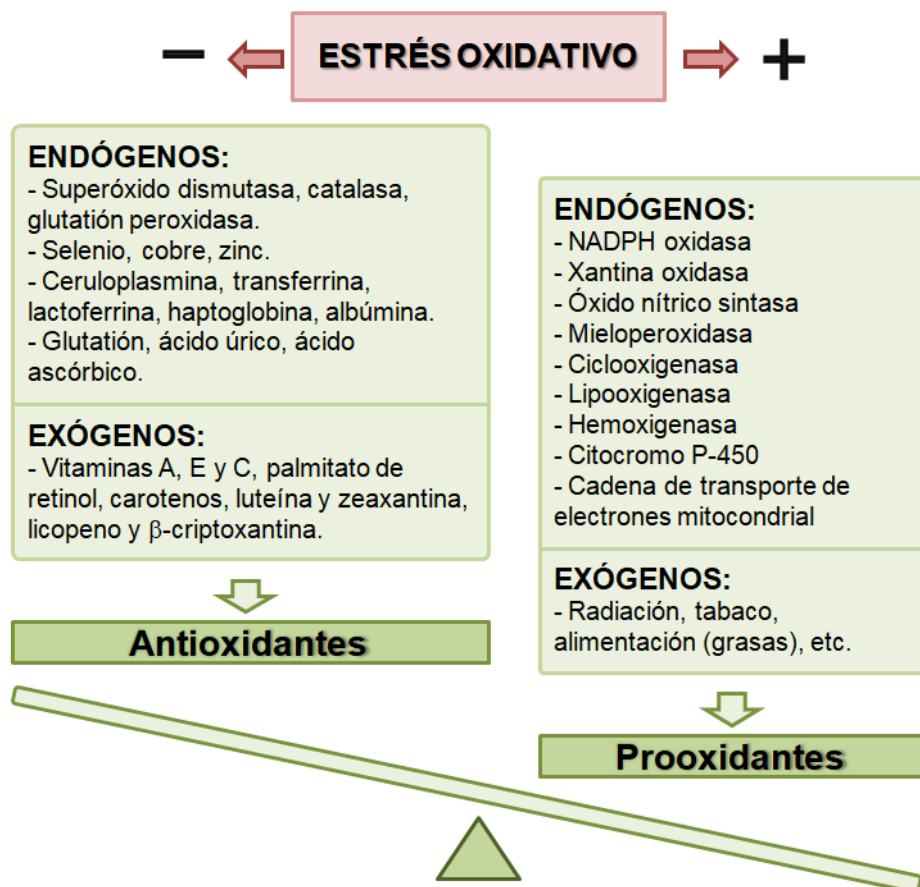


Figura 7. Representación gráfica del estrés oxidativo.

1.2.2 Daño oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante

Las reacciones de tipo redox son la base del mecanismo de oxidación que tiene lugar en múltiples procesos orgánicos, tanto fisiológicos como patológicos. Cuando se altera la homeostasis de oxido-reducción intracelular puede haber un aumento de radicales libres que produzca daño oxidativo. El uso de biomarcadores de estrés oxidativo surge debido al descubrimiento del incremento del estrés y daño oxidativo en condiciones patológicas.

- **Radicales libres y especies reactivas**

Los radicales libres (RL) son moléculas o fragmentos de moléculas, normalmente de bajo peso molecular, que en su estructura atómica presentan uno o más electrones no apareados. Esta configuración electrónica proporciona

al RL una elevada inestabilidad y reactividad, siendo la base de su toxicidad y de su vida media corta. La elevada reactividad favorece la atracción de electrones de átomos presentes en otras moléculas para recobrar su equilibrio. Al recibir un electrón libre, el RL quedará reducido y la sustancia que lo cede quedará oxidada⁹⁹.

La mayoría de los RL presentes en los sistemas biológicos son derivados del oxígeno. Se denominan especies reactivas del oxígeno (ERO) al conjunto de derivados radicales, iones de oxígeno y peróxidos que tienen capacidad de producir daño oxidativo. De forma análoga existen especies reactivas del nitrógeno (ERN), especies reactivas del azufre (ERS), especies reactivas del cloro (ERCI) y especies reactivas del bromo (ERBr)¹⁰⁰ (Tabla 5).

Tabla 5. Especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno, especies reactivas de azufre y especies reactivas de cloro.

	ERO		ERN		ERS		ERCI	
Radicales	Anión superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Óxido nítrico	NO^{\cdot}	Radical tiilo	RS^{\cdot}		
	Hidroxilo	$\cdot OH$	Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\cdot}				
	Alcóxido	RO^{\cdot}						
	Peróxido	ROO^{\cdot}						
	Hidroperóxido	$ROOH^{\cdot}$						
No radicales	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Peroxinitrilo	$ONOO^-$			Ácido hipocloroso	$HOCl$
	Ácido hipocloroso	$HClO$	Ácido nitroso	HNO_2				
	Ozono	O_3	Catión nitrosilo	NO^+				
	Oxígeno singlete	$^1\Delta O_2$	Anión nitroxilo	NO^-				
			Peroxinitritos alkilo	$ROONO$				

- **Sistemas enzimáticos productores de radicales libres y especies reactivas**

Los principales sistemas enzimáticos que generan RL y ERO son la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida (NADPH) oxidasa, la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintasa (NOS), la mieloperoxidasa, la

ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la hemoxigenasa y el citocromo P-450. Otro foco de RL y ERO es la cadena de transporte de electrones mitocondrial y su salida al citoplasma¹⁰¹.

- NADPH oxidasa: el complejo NAPH/NADPH cataliza la producción de aniones superóxido. El anión superóxido es un potente agente oxidante, considerado el precursor de la mayoría de las ERO, y muy reactivo con moléculas de H₂O¹⁰².
- Xantina oxidasa: esta enzima metaboliza hipoxantina, xantina, y NADH para formar aniones superóxido y peróxido de hidrógeno. Ha sido involucrada en procesos de isquemia-reperfusión, siendo fuente de ERO durante la fase de perfusión^{103,104}.
- Mieloperoxidasa: está implicada en la producción de ácido hipocloroso y derivados a partir de peróxido de hidrógeno. Se ha relacionado con el daño de pared vascular en situaciones fisiopatológicas como la aterosclerosis¹⁰⁵.
- Óxido nítrico sintasa: existen tres isoformas de esta enzima, denominadas nNOS, iNOS y eNOS. En condiciones fisiológicas el óxido nítrico (NO) se sintetiza a partir de L-arginina pero, en condiciones de deficiencia de sustrato o cofactores, se produce una disminución de NO y un aumento de aniones superóxido y peroxinitrito¹⁰⁶. Además, la eNOS se ha relacionado con la salida al citoplasma de ERO procedentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en situaciones patológicas¹⁰⁵.

- ***Dianas biológicas y daño oxidativo***

Las principales dianas biológicas de las ERO son: los lípidos, las proteínas, los carbohidratos y el ácido desoxirribonucleico (ADN).

- Oxidación de lípidos: una de las principales dianas de los procesos de oxidación son los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares. La peroxidación de los ácidos grasos reduce la flexibilidad de las membranas celulares, está implicada en el proceso de aterosclerosis y conduce a la formación de malondialdehído (MDA), dienos conjugados e hidroperóxidos¹⁰⁷.
- Oxidación de proteínas: el daño oxidativo incluye peroxidación, cambios en la estructura terciaria, alteración de residuos aminoacídicos, fragmentación, formación de agregados, inactivación y degradación proteica. Los enlaces insaturados, los anillos aromáticos y los grupos tiol (-SH) son más susceptibles de ser dañados. El daño puede desencadenar pérdidas de actividad enzimática que afecte a la replicación o reparación del ADN¹⁰⁸, interferencias con la creación de potenciales de membrana y cambios en las proteínas celulares¹⁰⁹.
- Oxidación de carbohidratos: esta oxidación produce glicación de proteínas que, a su vez, puede causar lesiones celulares.
- Oxidación de ADN: los ácidos nucleicos pueden sufrir cambios en las bases nitrogenadas, enlaces cruzados con otras moléculas, pérdida de purinas, daños en la desoxirribosa, roturas en las cadenas del ADN y alteraciones en los sistemas de reparación^{110,111}. El ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo que el ADN nuclear debido a su

proximidad con la cadena de transporte de electrones mitocondrial y a no estar protegido por histonas^{112,113}.

▪ ***Mecanismos de defensa antioxidante***

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Para cumplir esta función, los antioxidantes son capaces de reaccionar con un RL, donando un electrón o un átomo de hidrógeno, y generar un radical más estable y menos tóxico.

La célula posee mecanismos de defensa antioxidantes que le permiten defenderse del daño provocado por el estrés oxidativo y que se pueden agrupar en: mecanismos antioxidantes enzimáticos, cofactores de enzimas antioxidantes, mecanismos no enzimáticos endógenos y mecanismos no enzimáticos exógenos.

- Mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos: constituyen la primera línea de defensa antioxidante y previenen el daño oxidativo interaccionando directamente con las ERO. Actúan como catalizadores y son reciclados de forma eficiente después de actuar¹¹⁴. Las enzimas que forman este sistema antioxidante enzimático son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx).

La SOD cataliza la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrogeno y la catalasa reacciona con el peróxido de hidrogeno para formar agua y oxigeno molecular¹¹⁵.

Por otro lado, la GPx ejerce una función fundamental como antioxidante protegiendo las membranas frente a la peroxidación lipídica¹¹⁶. Esta enzima cataliza la reducción de hidroperóxidos utilizando glutatión (GSH) como donador de electrones. El GSH oxidado (GSSG) es

reducido por acción de la glutatión reductasa (GRed) empleando NADPH (Figura 8).

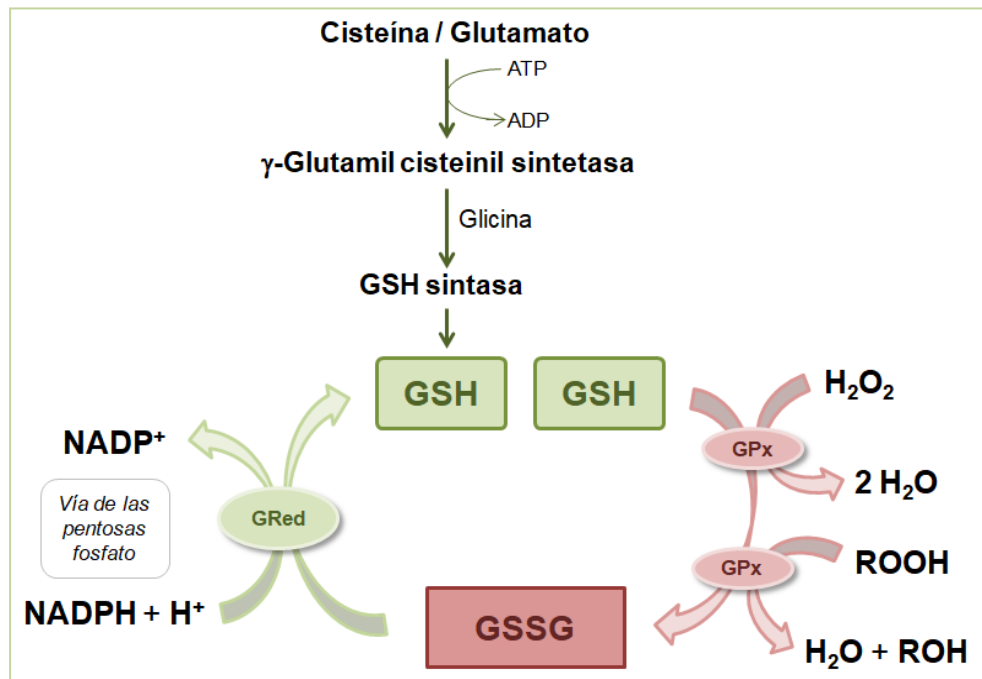


Figura 8. Reacciones catalizadas por la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GRed)¹¹⁷.

- Cofactores de enzimas antioxidantes: entre ellos se encuentran moléculas como el selenio, del que depende la actividad de GPx, o el cobre y el zinc, cuyos déficits disminuyen la actividad de la SOD y aumenta la actividad del citocromo P-450, estimulando la producción de ERO^{118,119}.

- Mecanismos de defensa antioxidante no enzimáticos endógenos: constituyen la segunda línea de defensa antioxidante y están formados por moléculas de bajo peso molecular que componen un grupo de antioxidantes capaces de prevenir el daño oxidativo por interacción directa o indirecta con las ERO.

Moléculas como la ceruloplasmina, la transferrina, la lactoferrina, la haptoglobina o la albúmina actúan de forma indirecta quelando metales

de transición para evitar su intervención en reacciones que generen RL y ERO¹²⁰.

Por otro lado, moléculas como el GSH, el ácido úrico o el ácido ascórbico intervienen de forma directa traspasando electrones o secuestrando RL. El GSH es un tripéptido con una vida media de segundos - minutos¹²¹ cuya capacidad antioxidante reside en su papel como cofactor de la GPx, su implicación en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática, su capacidad de neutralizar ERO como el anión superóxido o el oxígeno *singlete*, y su capacidad para recuperar las formas activas de otros antioxidantes como el ácido ascórbico y la vitamina E¹²². El ácido úrico, además de capacidad quelante de metales, posee propiedades protectoras frente a las ERN y al ozono¹²³. Por último, el ácido ascórbico actúa como cofactor de enzimas, interviene en reacciones enzimáticas para disminuir las concentraciones de peróxido de hidrógeno, interviene en la neutralización de iones superóxido, oxígeno *singlete* y ozono, y tiene un papel fundamental en la protección de la membrana plasmática frente a la peroxidación de lípidos¹²⁴.

- Mecanismos de defensa antioxidante no enzimáticos exógenos: a través de la dieta ingerimos nutrientes como vitaminas (A, C, E y carotenos), minerales (selenio, zinc, manganeso y magnesio) y otras sustancias (coenzima Q-10, flavonoides, antocianinas, indoles/tioles, isoflavonas, catequinas, lignanos, palmitato de retinol, licopeno, etc.) que protegen frente al estrés oxidativo, ya sea ejerciendo como antioxidantes de forma

directa o funcionando como cofactores de los sistemas antioxidantes endógenos¹²⁵.

1.2.3 Biomarcadores de estrés oxidativo

Los marcadores biológicos o biomarcadores de estrés oxidativo/nitrosativo se definen como aquellas enzimas específicas, factores o productos del daño oxidativo que pueden ser medidos y valorados de forma objetiva como indicadores de procesos fisiológicos, de procesos patológicos o de respuestas farmacológicas a un tratamiento. Por ello, idealmente, un biomarcador de estrés oxidativo debe caracterizarse por¹²⁶⁻¹²⁸ (Figura 9):

- Ser el producto de un daño oxidativo que pueda relacionarse con el inicio y progresión de una patología.
- Ser accesible en un tejido diana o plasma, reflejando los cambios oxidativos en estas muestras de forma cuantitativa.
- Ser un marcador específico para el estudio de especies reactivas e independiente de factores externos como la alimentación.
- Ser un parámetro sensible, robusto y reproducible mediante técnicas de análisis molecular.
- Ser una molécula estable para el manejo de muestras, incluyendo su procesamiento, análisis y almacenamiento.

A continuación, se describen brevemente algunos de los biomarcadores más utilizados del estrés oxidativo/nitrosativo.

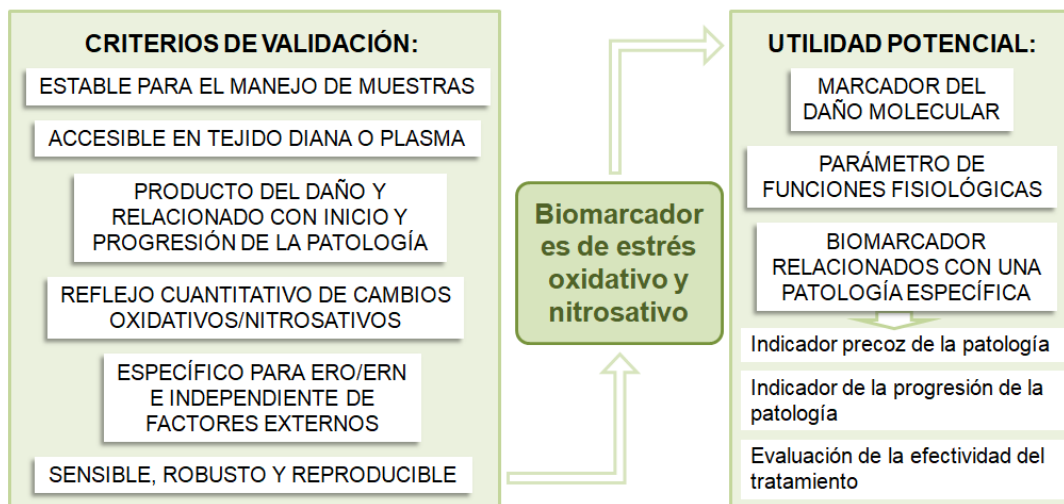


Figura 9. Esquema de los criterios de validación y utilidad potencial de los biomarcadores de estrés oxidativo/nitrosativo (adaptado de Dalle-Donne *et al.*¹²⁹).

▪ ***Biomarcadores de peroxidación lipídica***

- Malondialdehído (MDA): este biomarcador es un cetoaldehído producto de la descomposición de lípidos insaturados derivado del metabolismo del ácido araquidónico presente, fundamentalmente, en la membrana celular. El daño tisular puede aumentar los niveles de MDA y este reaccionar con residuos de lisina, produciendo alteraciones proteicas que desencadenan mecanismos inmunológicos relacionados con enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis o el infarto agudo de miocardio¹³⁰.
- Acroleína y 4-Hidroxi-2-nonenal (HNE): el 2-propenal o acroleína es un aldehído insaturado altamente reactivo presente ambientalmente por combustión de aceites, árboles, tabaco, gasolina y petróleo. De este compuesto deriva el HNE, otro aldehído de mayor toxicidad producido por el daño de ERO y ERN sobre los ácidos araquidónico, linoleico y linolénico¹³¹. Las concentraciones de acroleína y HNE se incrementan en situaciones patológicas de peroxidación lipídica y reaccionan con residuos de lisina, histidina y cisteína. El HNE puede reaccionar con fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos,

actuando como segundo mensajero en procesos de citotoxicidad, mutagénesis, toxicidad genética y apoptosis^{132,133}.

- Isoprostanos: son moléculas generadas por la peroxidación lipídica no enzimática que provocan radicales libres que reaccionan con el ácido araquidónico. Se encuentran en múltiples fluidos biológicos, siendo el plasma y la orina los más analizados para el estudio del daño oxidativo, pero las mediciones resultan complejas¹³⁴.

▪ ***Biomarcadores de oxidación de proteínas***

- Tioles y proteínas tioladas: los tioles (R-SH) son compuestos que contienen un grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno, confiriéndoles una elevada capacidad de oxidación. Como consecuencia de su alta reactividad con especies reactivas, la transformación de tioles en disulfuros (R-SS-R) se considera que está relacionada con una mayor carga de prooxidantes en células y tejidos y que la relación molar tiol/disulfuro (R-SH/R-SS-R) en células y tejidos puede ser un buen biomarcador del estrés oxidativo¹³⁵.

La mayoría de los grupos sulfhidrilo (-SH) están en residuos de cisteína y el tiol de bajo peso molecular más abundante en células animales es el glutatión reducido (GSH). El GSH proporciona equivalentes reductores para enzimas involucradas en el metabolismo de ERO y ERN, elimina productos de oxidación potencialmente tóxicos, reduce proteínas oxidadas o nitrosadas y contribuye al metabolismo de moléculas exógenas en las reacciones de fase II¹³⁶. La relación GSH/GSSG (Figura 9) está estrechamente regulada y es crítica para la supervivencia celular, afectando a la proliferación, diferenciación y apoptosis

celular¹³⁷. Además, el estado redox celular GSH/GSSG parece tener un papel importante en la supervivencia de células tumorales¹³⁸.

Los tioles pueden reducir proteínas oxidadas o nitrosadas mediante puentes disulfuro, formando proteínas tioladas (Proteína-SS-Tiol). La relación molar entre los tioles y las proteínas tioladas en plasma es aproximadamente 1:20¹³⁹ y el contenido de proteínas tioladas es probablemente proporcional a la relación molar tiol/disulfuro¹⁴⁰.

En la última década, se ha propuesto el índice de proteínas tioladas o IPT (Figura 10) como parámetro asociado a situaciones de oxidación, siendo validado y aplicado al plasma de seres humanos sanos y de sujetos afectados por patologías en las que se presume que existe estrés oxidativo¹⁴¹.

$$IPT = \frac{\sum \text{Proteínas tioladas}}{\sum \text{Tioles libres}}$$

Figura 10. El índice de proteínas tioladas es la relación molar entre la suma de los tioles de bajo peso molecular unidos covalentemente a proteínas plasmáticas y los tioles libres (adaptado de Dalle-Donne *et al.*¹²⁹).

- Carbonilos y proteínas carboniladas: los carbonilos pueden generarse por oxidación de cadenas laterales de aminoácidos mediante: formación de enlaces entre aldehídos insaturados y residuos de lisina, histidina y cisteína; glicación/glicoxidación de grupos amino de lisina¹⁴² (Figura 11). La formación de compuestos de carbonilo es el biomarcador de oxidación proteica más utilizado tanto in vitro como in vivo dada la estabilidad química de los carbonilos¹⁴³.

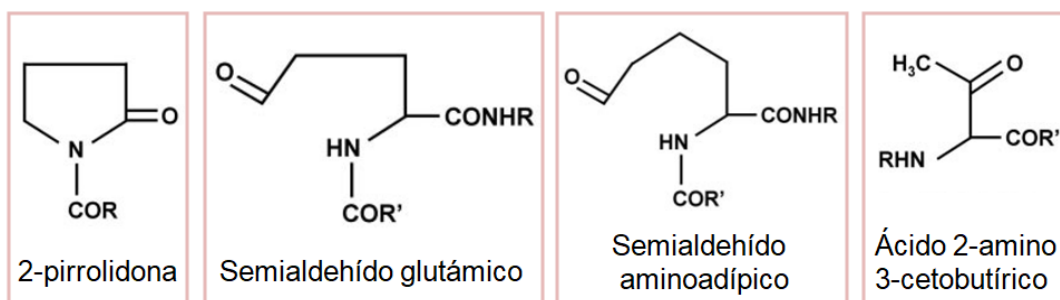


Figura 11. Estructuras químicas de los carbonilos que surgen de la oxidación directa de las cadenas laterales de aminoácidos¹²⁹.

- Oxidación, nitración y halogenación de tirosina: mediante estas reacciones se generan productos oxidados como la O,O'-ditirosina, derivados del NO como la 3-nitrotirosina y halogenados como la 3-clorotirosina y la 3-bromotirosina. La O,O'-ditirosina es una molécula metabólicamente estable y presenta la ventaja de ser detectable en orina humana, por lo que se ha propuesto como biomarcador no invasivo de la oxidación de proteínas¹²⁹.

▪ ***Biomarcadores de oxidación de ADN***

- 8-Hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG): es un compuesto derivado de la oxidación de la guanina que, apareándose con las bases nitrogenadas de adenina o citosina, induce mutaciones en el ADN por sustitución de purinas por pirimidinas o viceversa^{109,144}. Pese a que la 8-OHdG es considerada como un potente inductor de daño oxidativo, la interpretación de sus valores es controvertida y se necesitan más estudios que ayuden dilucidar si sus variaciones responden a una mayor exposición a especies reactivas o la existencia de un sistema eficaz de reparación de ADN¹⁴⁵.

- Glicol timidina: La 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimidina o glicol timidina es el producto de la oxidación de timidina por el radical hidroxilo. A diferencia de la mayoría de los derivados de la timidina, la glicol timidina posee una elevada

capacidad de mutagénesis sobre las moléculas de ADN, produciendo un daño oxidativo letal¹²⁸.

▪ ***Mecanismos enzimáticos y no enzimáticos antioxidantes***

- Glutación (GSH): el GSH sintetizado en el interior de las células puede ser exportado rápidamente a través de la membrana plasmática hacia el espacio extracelular. La vida media del GSH en plasma es de segundos-minutos¹⁴⁶. Las concentraciones de GSH en plasma son un reflejo del GSH tisular por lo que las concentraciones de GSH y GSSG, así como el ratio GSH/GSSG, se consideran parámetros que reflejan el estrés oxidativo en el organismo¹⁴⁷.

- Superóxido dismutasa (SOD): esta enzima es una de las defensas celulares más importantes frente al radical superóxido. Se conocen tres isoenzimas, cada una con una localización y un cofactor específicos: SOD1 (Cu/Zn-SOD intracelular), localizada en el citoplasma y, en menor medida, en el espacio intermembrana de la mitocondria; SOD2 (Mn-SOD), localizada en la matriz mitocondrial; SOD3 (Cu/Zn-SOD extracelular), análoga de SOD1 pero localizada en el espacio extracelular¹⁴⁸.

- Catalasa: esta enzima complementa la acción de la SOD catabolizando peróxido de hidrógeno (parece ser que únicamente las moléculas de origen exógeno¹⁴⁹) en oxígeno sin generar radicales libres¹⁵⁰. Las concentraciones de catalasa y su actividad varían en función del órgano, siendo elevadas en tejido hepático y eritrocitos, moderadamente elevadas en tejido renal y adipocitos, y baja en tejido cardíaco y tejido cerebral¹⁵¹.

- Hemooxigenasa I: es la isoforma inducible de la principal enzima del catabolismo del grupo hemo. Esta proteína participa en la regulación de procesos inflamatorios, en mecanismos de defensa antioxidante endógenos y

en la protección frente a la apoptosis, implicándose en varias rutas de señalización celular¹⁵².

- Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y nitritos: la iNOS genera óxido nítrico que produce vasodilatación, potencial daño celular y disfunción cardiaca. Su actividad citostática y citotóxica intervienen en la defensa frente a infecciones y células tumorales. Esta enzima está presente en macrófagos, neutrófilos, queratinocitos, células mesangiales, hepatocitos, fibroblastos, células musculares lisas y cardiomiocitos¹⁵³.

Por otro lado, los nitritos totales son una forma de cuantificar los niveles de estrés nitrosativo y se utilizan como biomarcador de los niveles de producción de NO. Una superproducción de NO desencadena su reacción con el anión superóxido y produce radicales peroxinitrilo. El radical peroxinitrilo es una ERN altamente reactiva que oxida y nitra, entre otros componentes celulares, lípidos, residuos de tirosina, ADN y enzimas. Este radical también produce daño mitocondrial irreversible y reduce antioxidantes endógenos como el GSH, la SOD o el ácido ascórbico¹⁵⁴.

1.2.4 Estrés oxidativo en la práctica clínica

La introducción de los biomarcadores de estrés oxidativo en la práctica clínica surge tras el descubrimiento del incremento del daño oxidativo y sus productos en condiciones patológicas. Los objetivos de los biomarcadores de estrés oxidativo son desarrollar nuevas estrategias preventivas, diagnósticas y terapéuticas en múltiples patologías, entre las que se encuentran las enfermedades cardiovasculares. Por ello, los biomarcadores ofrecen información sobre tres niveles progresivos de la enfermedad¹⁵⁵.

1. Como marcadores del daño molecular a lípidos, proteínas, ADN, etc.
2. Como parámetros de funciones fisiológicas.
3. Como biomarcadores relacionados con una patología específica.

En el ámbito del diagnóstico de las enfermedades, mediante el desarrollo de biomarcadores se pretende intervenir en el diagnóstico pre-sintomático y sintomático, aportando parámetros que proporcionen evidencias sobre la eficacia clínica del uso de antioxidantes.

La mayoría de estudios de estrés oxidativo en seres humanos se realizan con muestras de sangre, aceptando la hipótesis de que una alteración del equilibrio oxidantes/antioxidantes en sangre puede reflejar la alteración que ocurre en otros tejidos menos accesibles¹⁵⁶. Esta hipótesis se sustenta en la idea de que el plasma y otros fluidos extracelulares proporcionan una matriz adecuada para estudiar el estrés oxidativo sistémico debido a la interacción continua con las células¹⁵⁷.

Múltiples estudios analizan el papel de los biomarcadores de estrés oxidativo en el ámbito de las enfermedades cardiovasculares (Tabla 6). Entre ellos destacan los estudios que relacionan: el incremento MDA con la aterosclerosis o el infarto agudo de miocardio¹³⁰; la alteración del equilibrio tiol/disulfuro con la diabetes mellitus (DM) y la preeclampsia¹⁵⁸⁻¹⁶⁰; las concentraciones plasmáticas de carbonilos proteicos con la enfermedad renal crónica (ERC), la DM y la inflamación miocárdica¹⁶¹; la elevación de 8-OH-dG con la aterosclerosis, patología coronaria, infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca¹⁴⁴; la actividad de la SOD con la hipertensión¹⁶².

Tabla 6. Asociación entre biomarcadores de estrés oxidativo y enfermedades cardiovasculares (adaptado de Rossi *et al.*¹⁶³).

Patología	Biomarcadores de estrés oxidativo
Agregación plaquetaria	Hemooxigenasa I
Angor e infarto agudo de miocardio	MDA; Isoprostanos; 8-OHdG; Hemooxigenasa I
Aterosclerosis	MDA; HNE; Isoprostanos; Derivados de la tirosina; Hemooxigenasa I; 8-OHdG; NADPH oxidasa
Daño por isquemia-reperfusión	Isoprostanos; Hemooxigenasa I
Daño vascular	Hemooxigenasa I
Diabetes mellitus	MDA; Isoprostanos; Proteínas S-glutationadas; Proteínas carboniladas; Derivados de la tirosina; GSH y/o relación GSH/GSSG; NADPH oxidasa; Hemooxigenasa I
Dislipemia	Isoprostanos; Proteínas S-glutationadas; Derivados de la tirosina
Patología coronaria	Isoprostanos; Derivados de la tirosina; 8-OHdG
Hipertensión	Radical superóxido; MDA; Isoprostanos; GSH; SOD; Catalasa; NADPH oxidasa; Hemooxigenasa I
Inflamación miocárdica	Proteínas carboniladas; Derivados de la tirosina
Insuficiencia cardíaca	Isoprostanos; 8-OHdG
Insuficiencia renal aguda	Hemooxigenasa I
Insuficiencia renal crónica	Isoprostanos; Proteínas carboniladas; Derivados de la tirosina
Obesidad	Isoprostanos; 8-OHdG
Preeclampsia	MDA; Proteínas carboniladas; Derivados de la tirosina; GSH y/o relación GSH/GSSG; Hemooxigenasa I

MDA: Malondialdehido; 8-OHdG: 8-Hidroxi-2'-deoxiguanosina; HNE: 4-Hidroxi-2-nonenal; NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida; GSH: Glutación reducida; GSSG: Glutación oxidado; SOD: Superóxido dismutasa.

1.3 Indicadores globales de estrés oxidativo: OXY-SCORE

1.3.1 Definición

En la última década, Veglia *et al.*¹⁶⁴ han propuesto un indicador global de estrés oxidativo u OXY-SCORE. El OXY-SCORE reúne mediciones de daño oxidativo y mediciones de defensas antioxidantes con el objetivo de tener en cuenta la naturaleza multifactorial del estrés oxidativo. Para su cálculo se seleccionaron el MDA, los isoprostanos y la relación GSH/GSSG como biomarcadores de daño oxidativo, y el GSH, el tocoferol y un índice de la capacidad antioxidante del plasma como factores antioxidantes.

El OXY-SCORE diseñado por Veglia *et al.* también refleja características de los sujetos, como la edad y el sexo, que pueden estar relacionadas y afectar al estrés oxidativo y a las patologías presentes, como la patología cardiovascular, discriminando entre entornos clínicos caracterizados por un estado oxidativo alto o bajo.

Para calcular el OXY-SCORE, se determinan dos indicadores parciales: el *Damage Score* (DS), que resume el componente de daño, y el *Protection Score* (PS), que resume las defensas antioxidantes. Por lo tanto, el OXY-SCORE global se calcula restando el DS del PS y genera un número que refleja el equilibrio entre los sistemas oxidantes-antioxidantes (Figura 12).

$$\text{OXY-SCORE} = \frac{\text{Protection Score}}{(\Sigma \text{ biomarcadores antioxidantes})} - \frac{\text{Damage Score}}{(\Sigma \text{ biomarcadores oxidativos})}$$

Figura 12. Fórmula del OXY-SCORE

1.3.2 Utilidad

El rendimiento del OXY-SCORE ha sido probado en varios estudios centrados en patología cardiovascular. Uno de los estudios del grupo de Veglia comparó la puntuación obtenida en pacientes sanos con la de pacientes con patología coronaria¹⁶⁵. El OXY-SCORE fue significativamente mayor en los pacientes con patología coronaria que en los controles y el análisis de la curva ROC mostró un área bajo la curva de 0,78 para PS, 0,94 para DS y 0,96 para OXY-SCORE, demostrando que la capacidad del OXY-SCORE para discriminar entre pacientes con patología coronaria y sanos es muy alta. Otro estudio analizó la utilidad del OXY-SCORE y de sus componentes en pacientes sometidos a cirugía de revascularización coronaria, con o sin bypass

cardiopulmonar, conociendo las variaciones del equilibrio oxidativo que se producen en cada uno de estos dos escenarios^{166,167}. El OXY-SCORE aumentó en los procedimientos con bypass cardiopulmonar, alcanzando su valor máximo durante el procedimiento y disminuyendo al final de la cirugía pero manteniéndose por encima de los valores basales incluso a las 24 horas de la intervención quirúrgica. Sin embargo, el OXY-SCORE aumentó en menor medida en las intervenciones sin bypass cardiopulmonar, manteniéndose también por encima de los valores basales hasta 24 horas después de la intervención.

En resumen, los estudios disponibles sugieren que el OXY-SCORE puede ser más sensible que los biomarcadores de estrés oxidativo utilizados de forma individual.

1.4 Justificación del estudio

A continuación se presentan los principales resultados, extraídos de la revisión bibliográfica realizada y de trabajos previos de nuestro grupo, que justifican la hipótesis y objetivos que se plantean en la presente tesis:

- La HVI es un problema en clínica humana, que aumenta la incidencia de eventos cardiovasculares y la mortalidad en los pacientes con esta cardiopatía estructural⁵⁹⁻⁶⁴.

- El ECG, la ecocardiografía y la RMC son herramientas diagnósticas de la HVI. Sin embargo, el ECG presenta baja sensibilidad y especificidad, la ecografía está limitada por la calidad de la ventana acústica y los equipos técnicos y la RMC tiene un coste elevado, requiere mayor tiempo para adquirir y

analizar datos, interfiere con la respiración, está asociada a riesgos en pacientes portadores de dispositivos ferromagnéticos e incompatibilidad en pacientes claustrofóbicos^{44,51,52,56}.

- El estrés oxidativo, desequilibrio global entre pro-oxidantes (lesivos) y antioxidantes (defensa) existente en un sistema biológico, en favor de los primeros, ha sido relacionado con la HVI.

- En la literatura encontramos indicadores para medir el status pro-oxidante o antioxidante en diversas patologías (entre ellas la HVI), pero ninguno de ellos puede ser considerado como estándar para medir cambios en el estado oxidativo. Los estudios basados en la medida individual de estos indicadores arrojan resultados contradictorios, ya que sólo describen parcialmente el estado oxidativo y suelen mostrar alta variabilidad intra e intersujetos^{165,168}.

- Previamente a este trabajo de tesis, nuestro grupo de investigación ya ha estudiado, en modelo animal de HVI, biomarcadores prooxidantes y antioxidantes en la HVI como futuras dianas terapéuticas^{94,169}.

En base a lo anterior, podemos decir que es necesario un indicador integral en la HVI que tenga en cuenta la naturaleza multifactorial del estrés oxidativo, incluyendo medidas tanto del daño oxidativo como del sistema de defensa antioxidante¹⁶⁴. Este indicador podría ser diagnóstico de la HVI y futura diana terapéutica. Por este motivo decidimos iniciar este estudio en pacientes con HVI.

2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Como hipótesis de trabajo, planteamos que hay un indicador integral de la HVI que tiene en cuenta la naturaleza multifactorial del estrés oxidativo, incluyendo tanto las medidas del daño oxidativo como las del sistema de defensa antioxidante, y que podría servir en un futuro como diagnóstico, monitorización y respuesta al tratamiento en los pacientes con HVI (H_1), asumiendo como hipótesis nula (H_0) el hecho de que no exista dicho indicador.

2.2 Objetivos

- ***Objetivo principal***

Estudiar el estado oxidativo del paciente con HVI diseñando y calculando un indicador integral que tenga en cuenta tanto el daño oxidativo como el sistema de defensa antioxidante. Para ello, planteamos los siguientes objetivos secundarios:

- ***Objetivos secundarios***

- I. Analizar biomarcadores prooxidantes plasmáticos (carbonilos, malondialdehído, proteínas tioladas) en pacientes con HVI.
- II. Analizar biomarcadores antioxidantes plasmáticos (capacidad antioxidante total, tioles totales, glutatión reducido, actividad superóxido dismutasa y actividad catalasa) en pacientes con HVI.
- III. Estudiar el índice de proteínas tioladas como nuevo parámetro de estrés oxidativo en la HVI.
- IV. Calcular un indicador global de estrés oxidativo (OXY-SCORE), a partir de biomarcadores individuales, en los pacientes con HVI.

2.3 Planteamiento

Para abordar los objetivos propuestos se planteó un estudio observacional, prospectivo, no aleatorizado, comparativo de dos grupos:

- Grupo estudio (n=35): pacientes con hipertrofia ventricular izquierda
- Grupo control (n=35): pacientes sin hipertrofia ventricular izquierda

Tras la obtención del dictamen favorable del Comité Ético de Investigación Clínica se procedió al reclutamiento consecutivo de los pacientes (tras la firma del consentimiento informado del paciente para su participación en el estudio) que ingresaban en la planta de Cirugía Cardiovascular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Cada paciente fue incluido en el grupo estudio/grupo control según el diagnóstico o ausencia de HVI en el estudio ecocardiográfico. Posteriormente, se realizó una extracción de sangre para el estudio del estrés oxidativo.

Variables del estudio:

- Variables demográficas, clínicas, ecocardiográficas y analíticas de los pacientes.
- Variables de estrés oxidativo: biomarcadores plasmáticos de defensa antioxidante (capacidad antioxidante total, tioles totales, GSH, actividad SOD y actividad catalasa) y biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo (carbonilos, MDA y proteínas tioladas).

Las variables de estrés oxidativo anteriormente descritas permitieron el cálculo de los parámetros:

- Índice de proteínas tioladas (IPT): ratio entre proteínas tioladas/tioles totales. Posteriormente se estudió la validez y fiabilidad diagnóstica del IPT como nuevo biomarcador de estrés oxidativo en pacientes con HVI.

- OXY-SCORE: se ha diseñado y calculado un indicador global de estrés oxidativo plasmático en la hipertrofia ventricular izquierda.

3

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Sujetos del estudio

Se incluyeron en el estudio 70 pacientes y se repartieron en dos grupos: un grupo control y un grupo con hipertrofia ventricular izquierda. La selección de los pacientes se realizó según los criterios de inclusión y exclusión establecidos.

▪ *Criterios de inclusión*

- Pacientes \geq 18 años.
- Pacientes ingresados en la planta de Cirugía Cardiovascular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.
- Pacientes cuya historia clínica incluya un estudio ecocardiográfico que indique la existencia o no de hipertrofia ventricular izquierda.

▪ *Criterios de exclusión*

- Pacientes que no cumplan todos los criterios de inclusión descritos anteriormente.
- Pacientes que no firmen el consentimiento informado.

3.1.2 Reactivos

Los reactivos usados para el estudio de los biomarcadores de estrés oxidativo son:

- Sal disódica del ácido batocuproinedisulfónico (BCS) Sigma-Aldrich B1125-1G
- Sulfato de cobre Sigma-Aldrich C-7631

- Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) Sigma-Aldrich 23,881-3
- 5,5-ditiobis (2-nitro ácido benzoico) (DNTB) Sigma-Aldrich D8130-1G
- L-Glutation reducido (GSH) G4251-300MG Sigma-Aldrich
- O-ftalaldehido (OPT) 9253 Fluka
- Guanidina Sigma-Aldrich G4505-100G
- Etanol Sigma-Aldrich 147559
- Acetato de etilo Sigma-Aldrich 324027
- Cloruro de vanadio Sigma-Aldrich 20,827-2
- Albúmina de suero de bovino (BSA) Sigma-Aldrich A7906-10G
- Reactivo de Bradford (colorante de azul Coomassie) Protein Assay 161-0700 Bio-Rad
- Tris base Roche 10708976001
- Ninhidrina Sigma-Aldrich 151173-10G
- N-etilmaleimida (NEM) E3876 Sigma-Aldrich
- Ácido tricloroacético (TCA) Sigma-Aldrich T6399-100G
- Ditioteitrol (DTT) D0632 Sigma-Aldrich
- Ácido iodoacético (IAA) Sigma-Aldrich 14386-10G
- Hidrindantina Fluka 53940-10G
- Dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma-Aldrich D8418-50ML
- Dinitrofenilhidrazina (DNPH) Sigma-Aldrich D199303-25G
- Hidróxido de sodio Sigma-Aldrich S5881-500G
- Coelenterazina (CTZ) C3355 Sigma-Aldrich
- Superóxidodismutasa (SOD) de bovino S9697 Sigma-Aldrich
- Hipoxantina (Hx) S9697 Sigma-Aldrich

- Tritón Sigma-Aldrich T8787-50ML
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) Sigma-Aldrich T5500-25G
- 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (*Amplex Red*) Sigma Aldrich 90101-5MG-F
- Peroxidasa tipo I de rábano (HRP) Sigma Aldrich P8125-25KU
- 1,1,3,3-tetraetoxipropano Sigma Aldrich T9889-25ML
- Catalasa de hígado bovino 12660 U/mg Calbiochem

3.1.3 Equipos

El ecocardiograma se realizó usando un sistema comercial de ecocardiografía iE33[®] (Philips, CA, USA) (Figura 13) equipado con una sonda sectorial S5-1 (1-5 MHz) (Figura 14).

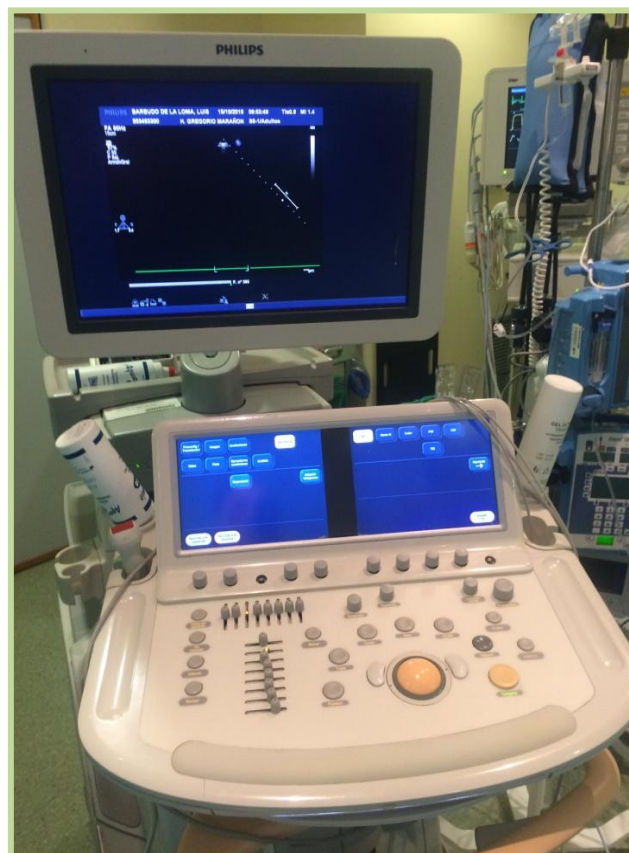


Figura 13. Equipo de ecocardiografía iE33[®].



Figura 14. Transductor S5-1.

Los equipos utilizados para el estudio de los biomarcadores de estrés oxidativos son:

- Centrífuga MEDIFRIGE (P Selecta)
- Lector de placas multidetección Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc., Potton, UK)
- Baño María (Unitronic 320 OR)
- Incubador IG150
- pH-metro XS pH 510 (EUTECH Instruments)
- Sistema de agua desionizada Ultra pure Water Milli-Q Plus (Millipore)

3.2 Métodos

3.2.1 Consideraciones éticas y legales

El estudio presenta el dictamen favorable del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) (ANEXO 1) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (30 de Noviembre del 2015, cumpliendo los requisitos establecidos en la legislación vigente -Real Decreto 223/2004 y Decreto 39/94 de la Comunidad de Madrid-). El CEIC, en su informe, hace constar que:

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos legalmente establecidos y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para la obtención del consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado el CEIC, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos del estudio, sólo han tenido acceso a ellos el CEIC del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, el investigador principal del estudio y su equipo de colaboradores. Los datos han sido tratados ajustándose a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre sobre Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD).

Todos los pacientes que participaron en el estudio dieron su consentimiento informado por escrito previo a la inclusión en el mismo (ANEXO 2).

3.2.2 Diseño del estudio

Diseñamos un estudio observacional, prospectivo, no aleatorizado, comparativo de dos brazos:

- Grupo HVI (n=35): con hipertrofia ventricular izquierda
- Grupo control (n=35): sin hipertrofia ventricular izquierda

Los pacientes (siguiendo los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente) fueron reclutados de manera consecutiva tras ingresar en la

planta de Cirugía Cardiovascular del HGUGM para someterse a cirugía cardiaca programada. Una vez firmado el consentimiento informado, se procedió a la recogida de las variables demográficas y clínicas en el cuaderno de recogida de datos. Posteriormente, el paciente fue incluido en el grupo control o en el grupo HVI según el diagnóstico o ausencia de HVI del estudio ecocardiográfico. El diagnóstico de HVI por ecocardiograma se definió según las últimas Guías de Práctica Clínica de la *American Society of Echocardiography* y la *European Association of Cardiovascular Imaging*⁴⁹.

Posteriormente, se procedió a la extracción de la muestra de sangre para el estudio de las variables analíticas (procesadas en el laboratorio central del HGUGM) y las variables de estrés oxidativo (procesadas por nuestro grupo de investigación en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del HGUGM).

- ***Variables del estudio***

- Variables demográficas, clínicas, ecocardiográficas y analíticas:

- *Variables demográficas:* edad, sexo, peso, altura, ASC.
- *Variables clínicas:*
 - Patologías de base: HTA, DM, dislipemia (DL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de apnea hipopnea obstructiva del sueño (SAHOS), insuficiencia hepática, enfermedad renal crónica, hábito tabáquico, hábito enólico, enfermedad tiroidea, insuficiencia venosa crónica.
 - Patología cardiaca: coronaria, valvular.
 - Tratamientos farmacológicos: ARA II, β -bloqueante, IECA, diurético, antagonista del calcio, antiagregante, anticoagulante.

- *Variables ecocardiográficas:* grosor pared posterior (PPVId), grosor septo interventricular (SIVd), diámetro telediastólico (DVId), diámetro telesistólico (DVIs), masa del VI, masa del VI indexada por superficie corporal (MVIsc), disfunción sistólica, disfunción diastólica.
- *Variables analíticas:*
 - Hemograma: hematíes, hemoglobina (Hb), hematocrito (Hcto), leucocitos, plaquetas.
 - Hemostasia: *International Normalized Ratio* (INR), tiempo trombotoplastina parcial activado (TTPA).
 - Bioquímica: glucosa, alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina, gamma glutamil transpeptidasa (GGT), proteínas, creatinina (Cr), filtrado glomerular (FG), creatinquinasa (CK), troponinas.

- Variables de estrés oxidativo:

A continuación, describimos las variables de estrés oxidativo mostrando los biomarcadores de defensa antioxidante y de daño oxidativo plasmáticos:

- *Biomarcadores de defensa antioxidante:*
 - Capacidad antioxidante total (TAC)
 - Tioles totales
 - Glutation reducido (GSH)
 - Actividad superóxido dismutasa (SOD)
 - Actividad catalasa
- *Biomarcadores de daño oxidativo:*
 - Carbonilos
 - Malondialdehído (MDA)
 - Proteínas tioladas

Las variables de estrés oxidativo anteriormente descritas permitieron calcular dos parámetros:

- IPT: ratio entre proteínas tioladas/tioles totales.
- OXY-SCORE: indicador global de estrés oxidativo plasmático en la hipertrofia ventricular izquierda.

3.2.3 Método de estudio del estrés oxidativo

La sangre de los sujetos objeto de estudio se extrajo mediante punción venosa del brazo. Un volumen de 2.4 mL de sangre se adicionó a tubos que contenían 300 µL de citrato (BD Vacutainer®, BD-Phymouth, PL6 7BP, UK) y se transportaron a 4°C al laboratorio para su procesamiento. Las muestras se sometieron a centrifugación a 900 g durante 10 minutos a 4°C. El plasma obtenido se almacenó a -80°C en alícuotas de 200 µL hasta su posterior uso.

▪ *Cuantificación de la capacidad antioxidante plasmática*

- Método CUPRAC-BCS:

Existen diferentes métodos basados en la reducción del cobre que son aptos para medir la capacidad antioxidante total (TAC) de fluidos biológicos. Estos métodos difieren entre sí en el tipo de quelante utilizado para formar un complejo con el cobre monovalente que absorbe luz entre 450-490 nm. En el método CUPRACBCS, los antioxidantes no enzimáticos presentes en la muestra reducen el Cu^{2+} a Cu^{+} ; el cobre monovalente forma un complejo con la sal disódica del ácido batocuproinedisulfónico (BCS) que absorbe luz a 490 nm.

Protocolo experimental:

El protocolo experimental, descrito por Campos *et al.*¹⁷⁰, ha sido modificado con la dilución de la muestra de plasma directamente en tampón fosfato. La

reacción se desarrolla en placa de 96 pocillos; en cada pocillo se mezclan 10 μL de plasma y 190 μL de tampón fosfato (10 mM, pH=7,4) conteniendo 0,25 mM de BCS. Tras un periodo de 10 segundos, se mide la absorbancia inicial (A_i) del pocillo a 490 nm en un lector de placas. Posteriormente, se adiciona al pocillo 50 μL de solución acuosa de CuSO_4 (0,5 mM) y se incuba la mezcla por un periodo adicional de 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido ese periodo, se vuelve a medir la absorbancia final (A_f) a 490 nm.

Cálculos:

Para el cálculo del valor TAC de cada muestra se emplea el valor de la diferencia entre A_f y A_i , así como la recta de regresión resultante de aplicar el anterior protocolo, a concentraciones crecientes (0, 0,25, 0,50, 1, 1,5 y 2 mM) de un análogo de la vitamina E, el trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), utilizado como referente de actividad antioxidante.

- Cuantificación de tioles totales en plasma:

Para este tipo de análisis se empleó el reactivo de Ellman [5,5-ditiobis (2-nitro ácido benzoico) o DNTB] utilizando placas de 96 pocillos. Los grupos tioles, presentes en las proteínas o en los compuestos de bajo peso molecular, reaccionan con el DTNB que es reducido a tiol ácido 5-tionitrobenzoico (TNB), de color amarillo, que puede ser medido y cuantificado a 412 nm en un espectrofómeto UV/Vis.

Protocolo experimental:

El protocolo comienza con la adición a los pocillos de 10 μL de plasma o de diluciones crecientes de GSH (0 mM; 0,03125 mM; 0,0625 mM; 0,125 mM; 0,25

mM y 0,5 mM) para confeccionar la curva estándar. Como control negativo se incluyó un pocillo conteniendo 5 μ L de plasma y 100 μ L de tampón fosfato (100 mM, pH=7.4), con el objeto de corregir la contribución de las muestras de plasma al valor final de la absorbancia. Todos los pocillos, tanto los correspondientes a las muestras de plasma como los de la curva estándar o del control negativo, se realizaron por duplicado. A continuación, utilizando una micropipeta multicanal, se adicionó 100 μ L de DNTB (0,5 mM en tampón fosfato) a cada pocillo conteniendo las muestras o el GSH, pero no a los controles negativos. Se agitó la placa, protegida de la luz, en un agitador 3D durante 1 minuto y, seguidamente, se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad. Al cabo de este tiempo, fue leída la absorbancia a 412 nm en un lector de placas Synergy HT™.

Cálculos:

El nivel de tioles totales fue calculado a partir de la recta de calibrado del GSH y del contenido de proteína del plasma, medido según el método de Bradford.

- Cuantificación de GSH:

El nivel de GSH se cuantificó empleando un método espectro-fluorimétrico, basado en la reacción específica entre el o-ftalaldehído (OPT) y el GSH, que produce una intensa señal de fluorescencia¹⁷¹.

Protocolo experimental:

Se mezclaron 10 μ L de plasma con 12,5 μ L de HPO³ (25%) y 37 μ L de tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0). La mezcla se incubó a 4°C durante 10 minutos para favorecer la precipitación de proteínas plasmáticas. A

continuación, se separó el sobrenadante mediante centrifugación a 2100 g x 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se hizo reaccionar en una placa multipocillo 10 µL del sobrenadante, convenientemente diluido, con 10 µL de OPT (0.1% p/v en metanol) y 180 µL de tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0). Se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos y en ausencia de luz. La fluorescencia se midió en un lector de placa Synergy™ HT con $\lambda_{\text{excitación}} = 360 \pm 40 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 460 \pm 40 \text{ nm}$ y una sensibilidad de 75.

Cálculos:

La concentración de GSH se estimó a partir de la recta de calibrado de GSH preparado en el rango de 0-10 ng/µL y del contenido de proteína del plasma (método de Bradford).

- Determinación de la actividad SOD mediante el método SOSA (Superoxide Anion Scavenging Activity):

El método SOSA mide la capacidad de los antioxidantes presentes en una muestra de eliminar anión superóxido. Para ello, se usa la coelenterazina (CTZ) como sonda de detección de anión superóxido. La CTZ es oxidada para producir un anión excitado, la coelenteramida (CTA), que emite luz azul. La inhibición de la luminiscencia es directamente proporcional a la cantidad de antioxidantes que contiene la muestra¹⁷².

Protocolo experimental:

En primer lugar se adicionó la muestra/blanco/SOD seguido por la adición de la sonda de luminiscencia (CTZ), xantina oxidasa y finalmente el sustrato hipoxantina (Hx). Tras 30 segundos de reacción a temperatura ambiente, se midió la señal de luminiscencia (luminómetro de placa GloMax). La reacción se

llevó a cabo en tampón fosfato 100 mM, pH=7.4 (KPP), el cual se usó para disolver la SOD, diluir la muestra y la sonda de luminiscencia. Para disolver la xantina oxidasa y la hipoxantina, se adicionó 0.1 mM EGTA en KPP y 0.4 % v/v Tritón (KPET).

Cálculos:

Los valores de luminiscencia de las muestras/SOD se convirtieron a valores de inhibición mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición de luminiscencia} = 1 - (\text{Luminiscencia}_{\text{muestra ó SOD}} / \text{Luminiscencia}_{\text{blanco}})$$

Donde *Luminiscencia_{blanco}* representa la luminiscencia en ausencia de SOD. El valor SOSA de la muestra se obtuvo de la recta de calibrado de SOD (inhibición de luminiscencia *versus* log SOD) y del contenido de proteína de la muestra medido por el método de Bradford, respectivamente.

- Cuantificación de la actividad catalasa:

La actividad catalasa fue cuantificada empleando un método fluorimétrico basado en la oxidación de la sonda Amplex Red (AR) en presencia de HRP y H₂O₂. Así, en presencia de H₂O₂, el AR (un compuesto no fluorescente) es convertido en resorufina (un producto fuertemente fluorescente) por la acción de la peroxidasa tipo I de rábano (HRP). La catalasa cataliza la descomposición del H₂O₂ en H₂O y, por tanto, reduce la oxidación de la sonda.

Protocolo experimental:

El protocolo experimental se inició con la adición de 25 µL de plasma diluido [o blanco o catalasa (0-0.4 U/mL)] a un volumen igual de H₂O₂. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 37°C. Transcurrido ese periodo, se adicionó, con

una micropipeta multicanal, 50 μL del reactivo AR para medir la actividad catalasa (AR-CAT) a cada uno de los pocillos, incubando la mezcla durante 30 minutos a 37°C. La composición del reactivo AR-CAT aparece reflejada en la Tabla 7. Transcurrido el periodo indicado, y tras agitar la placa aproximadamente 3 segundos, se procedió a la lectura de la señal de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 530 \pm 25 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 590 \pm 35 \text{ nm}$) en un lector de placas multiusos Synergy™ HT.

Tabla 7. Composición del reactivo Amplex Red utilizado para medir la actividad catalasa (AR-CAT).

Stock de Amplex Red (10 mM disuelto en dimetilsulfóxido)	50 μL
Stock de HRP (100 U/mL disuelto en agua)	20 μL
Tampón Tris-HCl (100 mM; pH 7,5)	4930 μL

Cálculos:

La actividad catalasa plasmática, fue calculada a partir de la recta de calibrado realizada con los pocillos a los que se añadió catalasa, como se ha descrito en el protocolo experimental. La recta estándar se obtuvo por análisis de regresión lineal de los datos de inhibición de la fluorescencia de acuerdo a la ecuación que se muestra a continuación *versus* la concentración de catalasa en U/mL.

$$\text{Inhibición de Fluorescencia} = 1 - (\text{Fluorescencia}_{\text{muestra o catalasa}} / \text{Fluorescencia}_{\text{blanco}})$$

Donde: $\text{Fluorescencia}_{\text{blanco}}$ es la fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 530 \pm 25 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 590 \pm 35 \text{ nm}$) en ausencia de catalasa.

- Determinación del contenido de proteínas plasmáticas:

Se empleó el método de Bradford siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. De este modo, se hicieron reaccionar 10 μL de la muestra diluida

con 200 µL del reactivo de Bradford (colorante de azul Coomassie, Bio-Rad, España) diluido 5 veces. Tras 5 minutos de reacción, se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Biotek, Rochester, VT, USA). La concentración de proteína (µg/µl) en la muestra se estimó a partir de la recta de calibración con concentraciones crecientes (rango 0,1-0,5 µg/µl) de albumina de suero bovino (BSA).

- ***Cuantificación de la actividad oxidante plasmática***

- Determinación de proteínas tioladas:

Para el análisis de la concentración de proteínas tioladas se usó el método descrito por Giustarini *et al.*¹⁴¹ y Colombo *et al.*¹⁷³, que se basa en la detección de las proteínas tioladas mediante un método de espectrofotometría por unión al reactivo ninhydrina, que emite a una determinada longitud de onda.

Protocolo experimental:

Para ello, se mezclaron 30µl de plasma con 30µl de N-etilmaleimida (NEM) 4 mM. Tras 2 minutos, se acidificó la mezcla con 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 6%. A continuación, se procedió a una centrifugación 1000 g a 4°C durante otros 2 minutos seguido de un lavado del pellet con TCA 6% 3 veces. El pellet de proteína se resuspendió usando 100 µl de tampón fosfato 0,1M y pH=7,4 y 2 µl de ditioteitrol (DTT) 50 mM. Tras 20 minutos de agitación, se añadieron 20 µl de ácido iodoacético (IAA) y se dejó incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se desproteinizó la muestra mediante tratamiento con 6 µl de TCA 60% y se centrifugó a 10000 g a 4°C durante 2 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se mezclaron con tampón acetato 2,5 M pH=5,5 y el reactivo de ninhydrina preparado previamente [0,032 g de

ninhydrina + 0,0048 g de hidrindantina + 0,6 ml dimetilsulfóxido (DMSO) + 0,4 ml de tampón 2,5 M]. Las muestras se calentaron a 100°C durante 10 minutos y fueron analizadas mediante espectrofotometría con una longitud de onda de 570 nm.

- Cuantificación de carbonilos:

La cuantificación de carbonilos se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por Mesquita *et al.*¹⁷⁴.

Protocolo experimental:

Se mezclaron 30 µl de plasma con 30 µl de dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM en ácido clorhídrico (HCl) 2,5 M. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 15 µl de hidróxido de sodio (NaOH) 6 M y se procedió a su agitación para disolver la proteína. Pasados 10 minutos, se analizó la muestra mediante espectrofotometría con una longitud de onda de excitación de 450 nM.

- Cuantificación de malondialdehído (MDA):

El contenido de proteínas modificadas por MDA se midió mediante el método del ácido tiobarbitúrico (TBA)¹⁷⁵. Se precipitaron 20 µL de plasma con 60 µL de ácido tricloroacético (8% p/v) en frío durante 10 minutos. Seguidamente, se obtuvieron los pellets proteicos mediante centrifugación a 2100 g x 15 minutos (4°C) y lavado con 140 µL de ácido tricloroacético (6% p/v). Los pellets se incubaron a 60°C durante 90 minutos en presencia de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (1% v/v) y TBA (0.67% p/v) para facilitar simultáneamente la liberación del MDA de las proteínas plasmáticas y su reacción con el TBA. Transcurrido este periodo, las muestras se enfriaron inmediatamente en hielo, se centrifugaron a

2100 g x 15 minutos (4°C) y la absorbancia del sobrenadante obtenido se midió a 530 nm en un lector de placa Synergy™ HT. El contenido de proteínas modificadas por MDA se calculó a partir de una recta de calibrado construida en el rango de 0-0.06 nmol MDA.

3.2.4 Determinación del índice de proteínas tioladas y del OXY-SCORE

▪ *Determinación del índice de proteínas tioladas*

El índice de proteínas tioladas (IPT) es la relación molar entre la concentración de proteínas tioladas y la concentración de tioles libres en plasma. Es decir, elemento asociado a oxidación/elemento asociado a la capacidad antioxidante^{141,173}.

▪ *Determinación del parámetro OXY-SCORE*

El OXY-SCORE es un indicador integral que tiene en cuenta la naturaleza multifactorial del estrés oxidativo. El OXY-SCORE se ha calculado teniendo en cuenta biomarcadores de defensa antioxidantes determinados en el plasma (TAC, tioles totales, GSH, actividad SOD, actividad catalasa) y biomarcadores de daño oxidativo (carbonilos, MDA), de acuerdo con la metodología previamente descrita¹⁶⁴.

3.2.5 Diseño estadístico

▪ *Cálculo del tamaño muestral*

El tamaño muestral se calculó tomando como referencia la variable contenido de proteínas carboniladas debido a que es la variable que mayor variabilidad ha mostrado en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación¹⁷⁶. Con 35 pacientes en cada grupo, se obtiene una potencia del

80% = $(1 - \beta)$ para detectar diferencias entre las medias de los dos grupos. Se asume un riesgo alfa del 5% ($\alpha = 0,05$) y una desviación típica de 3. Se ha utilizado el programa GRANMO para el cálculo del tamaño muestral.

- **Análisis estadístico**

Las variables categóricas se expresaron en frecuencias y porcentajes, y se compararon ambos grupos (grupo control y grupo HVI) mediante la prueba chi-cuadrado (χ^2) de Pearson (prueba no paramétrica).

En el caso de las variables cuantitativas se analizó, en primer lugar, si la variable seguía una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov). En caso afirmativo, se aplicó la prueba t de Student para muestras independientes, expresando los valores como media \pm error estándar de la media (SEM). En caso negativo, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney (test no paramétrico), expresando los valores como mediana (percentil 25 - percentil 75). Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

El área bajo la curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) permitió la elección del punto de corte que maximizase el producto sensibilidad x especificidad para el IPT.

Para medir la validez y la capacidad diagnóstica del biomarcador IPT se han utilizado los siguientes indicadores: sensibilidad, especificidad y los valores predictivos (positivo y negativo) para los distintos puntos de corte. También se ha estudiado la razón de verosimilitud positiva (RV+) y la razón de verosimilitud negativa (RV-) que nos indican cuánto es más probable obtener un determinado resultado (IPT elevado) en presencia de la enfermedad (HVI).

El análisis de regresión logística se utilizó para medir el grado de asociación entre las variables HVI e IPT y para buscar variables de confusión mediante la

creación de un modelo con determinadas variables (sexo, edad, hábito tabáquico, HTA, DM, DL, ERC y patología coronaria y/o valvular). Esto permitió predecir si el IPT es un biomarcador de riesgo independiente. Se expresó como OR (IC 95%).

Todos los datos obtenidos fueron introducidos y analizados con el paquete estadístico SPSS 20.0 (IBM Corp, Armonk, New York, USA) para Windows y S-PLUS 6.1.

- ***Cálculo del OXY-SCORE en la hipertrofia ventricular izquierda***

Los diversos biomarcadores del sistema de defensa antioxidante así como los indicadores de daño oxidativo plasmático se incorporaron en un indicador global de estrés oxidativo siguiendo la metodología estadística ya descrita¹⁶⁴, siguiendo las siguientes etapas:

- Análisis de normalidad de los parámetros:

La normalidad de los biomarcadores antioxidantes y de los biomarcadores de daño oxidativo se analizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

- Transformación de los parámetros con distribución no normal:

Los parámetros con distribución no normal se normalizaron mediante transformación logarítmica. La normalidad de los parámetros transformados se constató mediante el análisis estadístico descrito anteriormente.

- Estandarización de los parámetros originales y normalizados:

Al ser parámetros con distintas unidades, se tuvo que proceder a una estandarización para poder realizar el sumatorio. Los datos individuales de los parámetros antioxidantes/oxidantes de los dos grupos de estudio (pacientes

controles/pacientes hipertróficos) se estandarizaron mediante la siguiente ecuación:

$$Z_{ij} = X_{ij} - \mu_j \sigma_j$$

Donde: Z_{ij} es el valor estandarizado del parámetro j del sujeto experimental i ; X_{ij} es el valor del parámetro j original o normalizado mediante transformación logarítmica; μ_j es el promedio del parámetro j y σ_j es la desviación estándar del parámetro j en los sujetos control.

- Cálculo del indicador global:

El indicador global de estrés oxidativo plasmático en la hipertrofia ventricular izquierda (OXY-SCORE) se cálculo mediante la ecuación:

$$\text{OXY-SCORE} = \Sigma \text{ antioxidantes} - \Sigma \text{ daño oxidativo}$$

El OXY-SCORE se calculó como el valor promedio \pm SEM para cada grupo de estudio. El indicador de daño oxidativo y el de protección antioxidante se dedujeron del promedio de los parámetros individuales.

Un valor del OXY-SCORE igual a cero o próximo a él significa que existe un balance entre los antioxidantes/daño oxidativo, mientras que un OXY-SCORE positivo indica una preponderancia de la capacidad antioxidante frente al daño oxidativo y un OXY-SCORE negativo se traduce como un predominio de daño oxidativo.

4

RESULTADOS

4.1 Caracterización de los sujetos de estudio

La edad y el peso de los pacientes del estudio siguieron una distribución normal, habiendo sido comprobado mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p = 0.456$ para la variable edad y $p = 0.884$ para la variable peso) (Tabla 8). La distribución porcentual del sexo de los pacientes del estudio aparece reflejada en la Tabla 9.

Tabla 8. Variables demográficas cuantitativas.

	Grupo control (n=35)	Grupo HVI (n=35)	p
Edad (años)	63 ± 2	69 ± 1	0.060
Peso (Kg)	75.4 ± 2.50	76.16 ± 2.33	0.623

Las variables se expresan como media ± error estándar de la media (SEM) y se comparan utilizando la prueba t de Student, con significación estadística si $p \leq 0.05$.

Tabla 9. Variable demográfica cualitativa.

		Grupo control (n=35)	Grupo HVI (n=35)	p
Sexo	Hombre	21 (60%)	23 (67.6%)	0.509
	Mujer	14 (40%)	11 (32.4%)	

Las variables se expresan como frecuencia y su correspondiente porcentaje y se comparan utilizando la prueba χ^2 de Pearson, con significación estadística si $p \leq 0.05$.

En primer lugar, utilizamos la prueba t de Student para comparar la media de los dos grupos y ver si las diferencias se podrían explicar por el azar. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la edad de los

pacientes del grupo HVI y del grupo control. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en el peso de los pacientes de ambos grupos.

En cuanto al género de los sujetos del estudio, utilizando la prueba χ^2 de Pearson para comparar proporciones, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la distribución de sexos entre el grupo control y el grupo HVI.

La distribución porcentual de las variables que reflejan los antecedentes personales de los pacientes se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Variables cualitativas de antecedentes personales.

	Grupo control (n=35)	Grupo HVI (n=35)	p
Hipertensión arterial	23 (65.7%)	28 (80%)	0.116
Diabetes Mellitus	7 (20%)	11 (31.4%)	0.243
Dislipemia	17 (48.6%)	22 (62.9%)	0.176
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	3 (8.6%)	4 (11.4%)	0.66
Síndrome de apnea/hipopnea obstructiva del sueño	2 (5.7%)	6 (17.1%)	0.122
Insuficiencia hepática	1 (2.9%)	0 (0%)	0.321
Enfermedad renal crónica	10 (28.5%)	9 (25.6%)	0.611
Hábito tabáquico	6 (17.1%)	4 (11.4%)	0.526
Hábito enólico	1 (2.9%)	1 (2.9%)	0.983
Enfermedad tiroidea	2 (5.7%)	5 (14.3%)	0.216
Patología valvular	15 (42.9%)	22 (62.9%)	0.093
Patología coronaria	3 (8.6%)	1 (2.9%)	0.204
Patología valvular y coronaria	17 (48.6%)	12 (34.3%)	0.264
Infarto agudo de miocardio reciente	4 (11.4%)	1 (2.9%)	0.174
Enfermedad vascular periférica	3 (8.6%)	7 (20%)	0.156
Insuficiencia venosa crónica	3 (8.6%)	0 (0%)	0.081

Las variables se expresan como frecuencia y su correspondiente porcentaje y se comparan utilizando la prueba χ^2 de Pearson, con significación estadística si $p \leq 0.05$.

Utilizando de nuevo la prueba χ^2 de Pearson, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las variables de los antecedentes personales de HTA, DM, DL, EPOC, SAHOS, insuficiencia hepática, ERC, hábito tabáquico, hábito enólico, enfermedad tiroidea, patología valvular, patología coronaria, patología valvular y coronaria, IAM reciente, enfermedad vascular periférica e insuficiencia venosa crónica.

En la Tabla 11 se muestra la distribución porcentual de las variables que reflejan los tratamientos farmacológicos de los sujetos del estudio.

Tabla 11. Variables cualitativas de tratamientos farmacológicos.

	Grupo control (n=35)	Grupo HVI (n=35)	p
Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina	13 (37.1%)	14 (40%)	0.731
Antagonistas del receptor de la angiotensina II	3 (8.6%)	7 (20%)	0.156
β-bloqueantes	11 (31.4%)	12 (34.3%)	0.733
Diuréticos	10 (28.6%)	15 (42.9%)	0.179
Antagonistas del Ca^{2+}	6 (17.1%)	11 (31.4%)	0.143
Antiagregantes	16 (45.7%)	13 (37.1%)	0.529
Anticoagulantes	Heparina Na	8 (22.9%)	0.535
	Acenocumarol	27 (77.1%)	

Las variables se expresan como frecuencia y su correspondiente porcentaje y se comparan utilizando la prueba χ^2 de Pearson, con significación estadística si $p \leq 0.05$.

En este caso, la prueba χ^2 de Pearson no detectó diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las variables de los tratamientos farmacológicos de los sujetos del estudio.

Por último, describimos las variables ecocardiográficas en ambos grupos, habiéndolas clasificado en variables cualitativas (Tabla 12), variables cuantitativas con distribución normal (Tabla 13) y variables cuantitativas con distribución no normal (Tabla 14).

Tabla 12. Variables ecocardiográficas cualitativas.

	Grupo control (n=35)	Grupo HVI (n=35)	p
Disfunción sistólica	14 (40%)	13 (37.1%)	0.881
Disfunción diastólica	10 (28.6%)	13 (37.1%)	0.185

Las variables se expresan como frecuencia y su correspondiente porcentaje y se comparan utilizando la prueba χ^2 de Pearson, con significación estadística si $p \leq 0.05$.

Tabla 13. Variables ecocardiográficas cuantitativas con distribución normal.

	Grupo control (n=35)	Grupo HVI (n=35)	p
Diámetro telediastólico (cm)	4.82 \pm 0.12	4.85 \pm 0.15	0.87
Diámetro telesistólico (cm)	3.2 \pm 0.17	3.5 \pm 0.18	0.237
Masa del ventrículo izquierdo indexada (g/m²)	88.78 \pm 4.45	141.82 \pm 8.64	<0.001

Las variables se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM) y se comparan utilizando la prueba t de Student, con significación estadística si $p \leq 0.05$.

Tabla 14. Variables ecocardiográficas cuantitativas con distribución no normal.

	Grupo control (n=35)	Grupo HVI (n=35)	p
Grosor pared posterior (cm)	0.9 (0.9 - 1.0)	1.2 (1.1 - 1.3)	<0.001
Grosor septo (cm)	0.9 (0.8 - 1.0)	1.2 (1.15 - 1.45)	<0.001
Fracción de eyección (%)	61 (53 - 62)	61 (53.75 - 61)	0.927

Las variables se expresan como mediana (percentil 25 - percentil 75) y se comparan utilizando la prueba U de Mann-Whitney, con significación estadística si $p \leq 0.05$.

Mediante la prueba χ^2 de Pearson, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las variables ecocardiográficas de disfunción sistólica y disfunción diastólica.

La prueba t de Student no mostró diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las variables ecocardiográficas diámetro telediastólico y diámetro telesistólico. Sin embargo, la masa del ventrículo izquierdo indexada por superficie corporal (MVIsc) en el grupo HVI fue significativamente superior a la del grupo control ($p < 0.001$).

Utilizamos una prueba no paramétrica como la prueba U de Mann-Whitney para comparar variables que no siguieron una distribución normal. El grosor de la pared posterior (PPVId) y el grosor del septo interventricular (SIVd) en el grupo HVI fueron significativamente superiores a los del grupo control ($p < 0.001$). No encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar la fracción de eyección en ambos grupos.

4.2 Estudio de las variables bioquímicas

Utilizando la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney en función de la distribución de las variables, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las variables bioquímicas analizadas en el estudio (hematíes, hemoglobina, hematocrito, plaquetas, leucocitos, INR, TTPA, glucemia, ALT, creatinina, filtrado glomerular, bilirrubina total, GGT, proteínas, troponina T y CK) (Tablas 15 y 16).

Tabla 15. Variables bioquímicas con distribución normal.

	Grupo control (n=35)	Grupo HVI (n=35)	p
Hemáties (x10 ⁶ /μL)	4.49 ± 0.12	4.43 ± 0.13	0.696
Hemoglobina (g/dL)	13.42 ± 0.34	12.94 ± 0.35	0.333
Hematocrito (%)	39.83 ± 0.94	38.61 ± 0.99	0.375
Plaquetas (x10 ³ /μL)	195514 ± 9918	211147 ± 11432	0.305
Leucocitos (x10 ³ /μL)	6966 ± 364	7538 ± 437	0.318
TTPA (s)	35.29 ± 0.85	36.73 ± 0.96	0.267
Proteínas (g/dL)	6.93 ± 0.10	6.89 ± 0.13	0.843

TTPA: Tiempo de tromboplastina parcial activado. Las variables se expresan como media ± error estándar de la media (SEM) y se comparan utilizando la prueba t de Student, con significación estadística si $p \leq 0.05$.

Tabla 16. Variables bioquímicas con distribución no normal.

	Grupo control (n=35)	Grupo HVI (n=35)	p
INR	1.00 (0.97 - 1.1)	1.04 (0.98 - 1.12)	0.227
Glucemia (mg/dL)	97 (91 - 89)	102 (119 - 133)	0.667
ALT (UI/L)	16 (12 - 25)	16 (11 - 23)	0.705
Creatinina (mg/dL)	0.91 (0.79 - 1.06)	0.95 (0.88 - 1.21)	0.223
Filtrado glomerular (mL/min)	61 (61 - 61)	61 (47 - 61)	0.406
Bilirrubina total (mg/dL)	0.55 (0.4 - 0.9)	0.50 (0.4 - 0.82)	0.771
GGT (UI/L)	23 (16 - 37)	21 (17 - 44)	0.971
Troponina T (ng/L)	15.5 (7.0 - 28.5)	18.0 (9.0 - 28.0)	0.559
CK (UI/L)	50 (39 - 81)	60 (33 - 74)	0.849

INR: *International Normalized Ratio*; ALT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma glutamil transpeptidasa; CK: Creatinquinasa. Las variables se expresan como mediana (percentil 25 - percentil 75) y se comparan utilizando la prueba U de Mann-Whitney, con significación estadística si $p \leq 0.05$.

4.3 Estudio del estatus antioxidante y parámetros de estrés oxidativo

A continuación, analizamos los resultados obtenidos del análisis de los biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo y los de defensa antioxidante.

4.3.1 Biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo

Los niveles plasmáticos de carbonilos y MDA se reflejan en la Tabla 17.

Tabla 17. Biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo.

	Grupo control (n=35)	Grupo HVI (n=35)	p
Carbonilos (nmol/mg proteína)	0.48 ± 0.04	0.53 ± 0.04	0.454
MDA (μM)	2.98 ± 0.19	3.54 ± 0.20	0.054

MDA: Malondialdehído. Las variables se expresan como media ± error estándar de la media (SEM) y se comparan utilizando la prueba t de Student, con significación estadística si $p \leq 0.05$.

El análisis de los biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo mediante la prueba t de Student mostró:

- *Concentración plasmática de carbonilos.* No hubo diferencias significativas en los niveles de carbonilos entre el grupo control y el grupo HVI ($p = 0.454$) (Figura 15.A).
- *Concentración plasmática de MDA.* No hubo diferencias significativas en los niveles de MDA entre el grupo control y el grupo HVI ($p = 0.054$) (Figura 15.B).

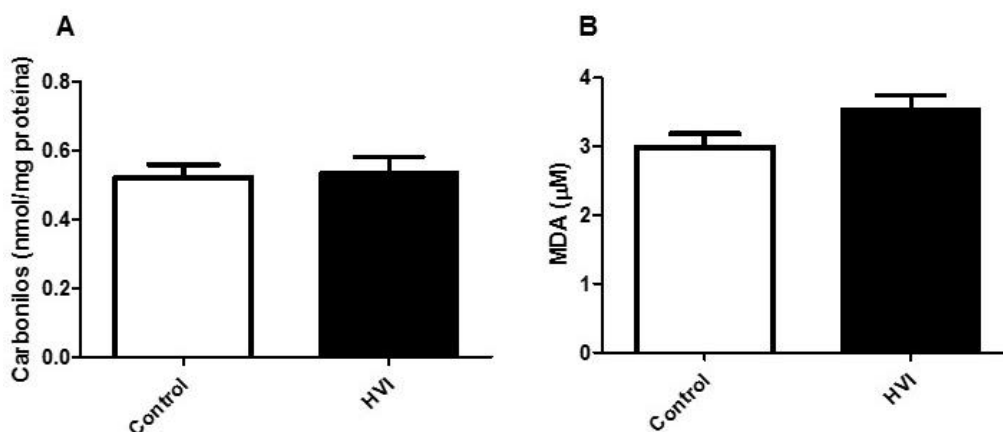


Figura 15. Distribución de los niveles de biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo en el grupo control y en el grupo HVI. A) Niveles plasmáticos de carbonilos totales. B) Niveles plasmáticos de MDA.

4.3.2 Biomarcadores plasmáticos de defensa antioxidante

Los niveles plasmáticos de GSH, actividad SOD, actividad catalasa y capacidad antioxidante total (TAC) se reflejan en la Tabla 18.

Tabla 18. Biomarcadores plasmáticos de defensa antioxidante.

	Grupo control (n=35)	Grupo HVI (n=35)	p
GSH (µmol/mg proteína)	67.78 ± 2.19	63.14 ± 1.42	0.082
Actividad SOD (mU SOD/mg proteína)	20.61 ± 0.85	18.83 ± 0.46	0.074
Actividad catalasa (U catalasa/mg proteína)	8.89 ± 0.81	8.32 ± 0.52	0.559
TAC (Trolox µM)	0.30 ± 0.01	0.27 ± 0.009	0.066

GSH: Glutacion reducido; SOD: superóxido dismutasa; TAC: Capacidad antioxidante total. Las variables se expresan como media ± error estándar de la media (SEM) y se comparan utilizando la prueba t de Student, con significación estadística si $p \leq 0.05$

El análisis de los biomarcadores antioxidantes plasmáticos mediante la prueba t de Student mostró:

- *Concentración plasmática de GSH.* No hubo diferencias significativas en los niveles de GSH entre el grupo control y el grupo HVI ($p = 0.082$) (Figura 16.A).

- *Actividad SOD.* La actividad SOD, estimada mediante el parámetro SOSA, no mostró diferencias significativas entre el grupo control y el grupo HVI ($p = 0.074$) (Figura 16.B).
- *Actividad catalasa.* No hubo diferencias significativas en la actividad catalasa entre el grupo control y el grupo HVI ($p = 0.559$) (Figura 16.C).
- *Capacidad Antioxidante Total (TAC).* No hubo diferencias significativas en la TAC entre el grupo control y el grupo HVI ($p = 0.066$) (Figura 16.D).

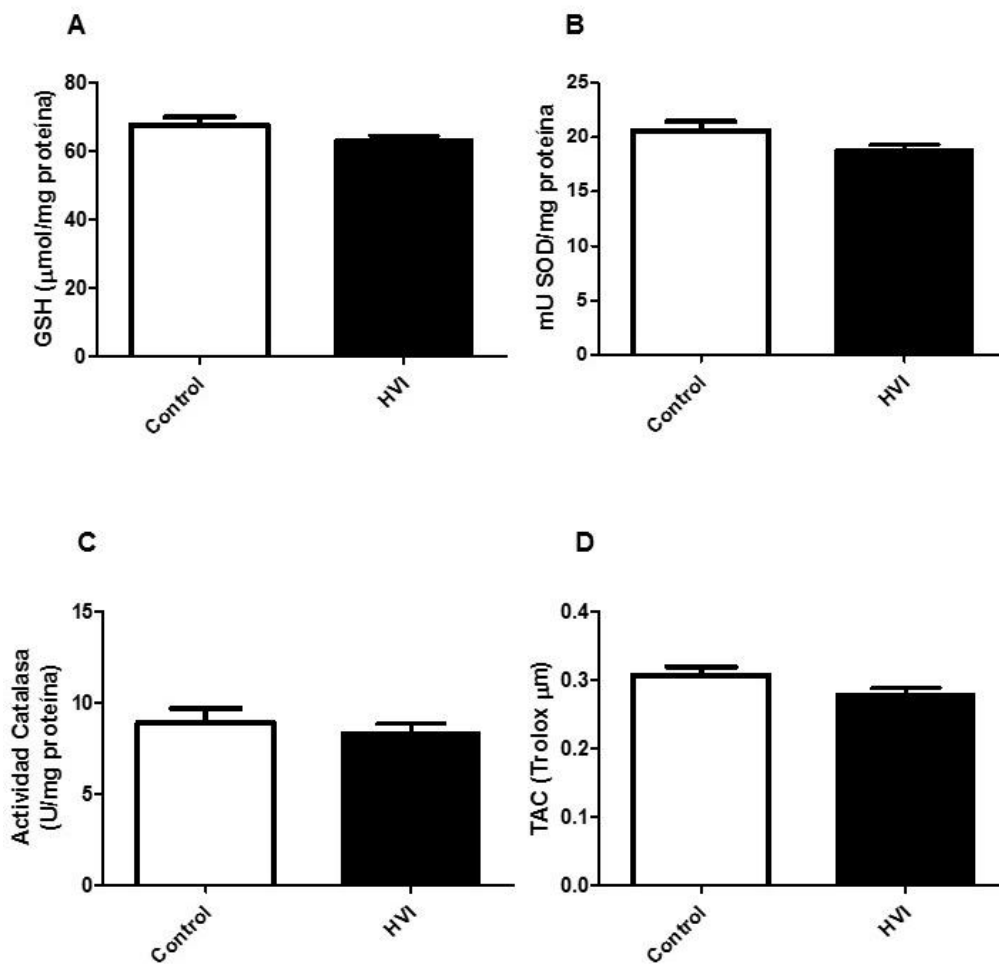


Figura 16. Distribución de los niveles de biomarcadores plasmáticos de defensa antioxidante en el grupo control y en el grupo HVI. A) Concentración plasmática de GSH. B) Actividad SOD. C) Actividad catalasa. D) Capacidad antioxidante total (TAC)

4.4 Estudio de nuevos biomarcadores de estrés oxidativo plasmático: Índice de proteínas tioladas

Los niveles plasmáticos de tioles totales, proteínas tioladas y el índice de proteínas tioladas (IPT) se reflejan en la Tabla 19.

Tabla 19. Tioles totales, proteínas tioladas e índice de proteínas tioladas.

	Grupo control (n=35)	Grupo HVI (n=35)	p
Tioles totales ($\mu\text{mol/mg}$ proteína)	7.819 \pm 0.35	6.970 \pm 0.39	0.079
Proteínas tioladas ($\mu\text{mol/mg}$ proteína)	0.079 \pm 0.005	0.102 \pm 0.006	0.010
Índice de proteínas tioladas	0.010 \pm 0.0006	0.014 \pm 0.0009	0.001

Las variables se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM) y se comparan utilizando la prueba t de Student, con significación estadística si $p \leq 0.05$.

El análisis de estos biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo mediante la prueba t de Student mostró:

- *Concentración plasmática de tioles.* No hubo diferencias significativas en los niveles de tioles entre el grupo control y el grupo HVI ($p = 0.079$) (Figura 17.A).
- *Concentración plasmática de proteínas tioladas.* El grupo HVI mostró un aumento significativo en los niveles de proteínas tioladas con respecto al grupo control ($p = 0.01$) (Figura 17.B).
- *Índice de proteínas tioladas (IPT).* El IPT, calculado como el ratio entre proteínas tioladas/tioles totales, fue significativamente mayor en el grupo HVI con respecto al grupo control ($p = 0.001$) (Figura 17.C).

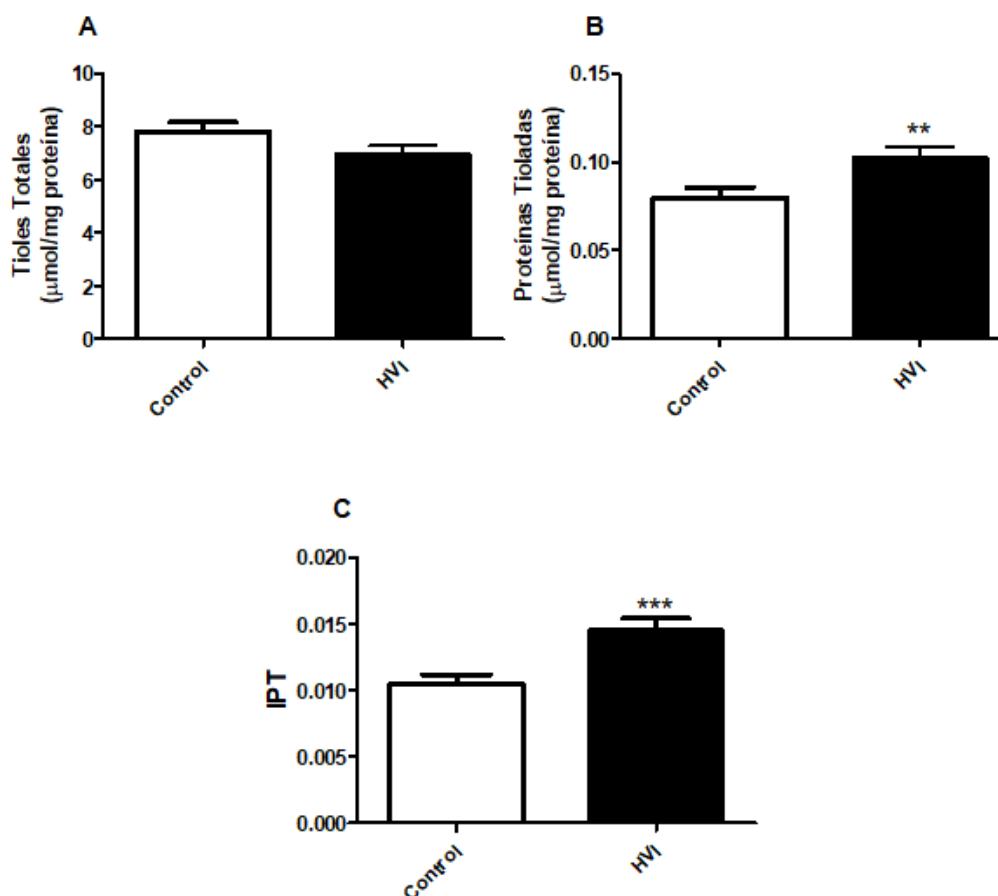


Figura 17. Distribución de los niveles de biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo en el grupo control y en el grupo HVI. A) Concentración plasmática de tioles totales. B) Concentración plasmática de proteínas tioladas. C) Índice de proteínas tioladas (IPT).

Tras obtener este resultado sobre el IPT, utilizamos el análisis de regresión logística para medir el grado de asociación entre las variables HVI e IPT y buscar variables de confusión mediante la creación de un modelo con determinadas variables (sexo, edad, hábito tabáquico, HTA, DM, DL, ERC y patología coronaria y/o vascular) (Tabla 20). El análisis mostró una asociación positiva entre IPT e HVI ($p < 0.01$) (OR = 1.24 [IC 95%, 1.05 - 1.47]) independientemente del sexo (OR = 2.62 [IC 95%, 0.61 - 11.30]), edad (OR = 1.06 [IC 95%, 0.99 - 1.13]), hábito tabáquico (OR = 2.24 [IC 95%, 0.32 - 15.46]), DM (OR = 1.60 [IC 95%, 0.36 - 6.98]), HTA (OR = 1.59 [IC 95%, 0.33 - 7.55]), DL (OR = 0.86 [IC 95%, 0.21 - 3.51]), ERC (OR = 0.40 [IC 95%, 0.09 - 1.68]), y patología coronaria y/o valvular (OR = 4.20 [IC 95%, 1.10 - 15.90]).

Tabla 20. Análisis de regresión logística.

	OR (IC 95%)	p
IPT	1.247 (1.053-1.476)	0.011
Sexo	2.938 (0.611-11.303)	0.194
Edad	1.063 (0.996-1.134)	0.065
HTA	1.599 (0.339-7.555)	0.553
DM	1.605 (0.369-6.986)	0.528
DL	0.863 (0.212-3.512)	0.837
Hábito tabáquico	2.247 (0.327-15.465)	0.411
Enfermedad renal crónica	0.404 (0.097-1.680)	0.213
Patología coronaria y/o valvular	4.200 (1.109-15.903)	0.035

Las variables se expresan como razón de probabilidad (odds ratio) y el intervalo de confianza (IC) del 95%, con significación estadística si $p \leq 0.05$.

El siguiente paso fue realizar un análisis de la especificidad y sensibilidad del IPT como herramienta para el diagnóstico de la HVI. Como los valores del IPT son numéricos, la sensibilidad y la especificidad varían en función del punto de corte elegido para clasificar a la población. Para ayudarnos en la elección del punto de corte diseñamos una curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) (Figura 18), representando en ordenadas la sensibilidad y en abscisas 1 - especificidad de todos los valores observados en nuestra prueba diagnóstica (IPT). El área bajo la curva (AUC) ROC es una medida global de la exactitud de una prueba diagnóstica. Por ello, calculamos el AUC del IPT para el diagnóstico de la HVI, que resultó ser 0.75. Es decir, que existe un 75% de probabilidad de que, si cogemos al azar un individuo sano y un individuo con HVI, encontremos valores de IPT más altos en el individuo con HVI.

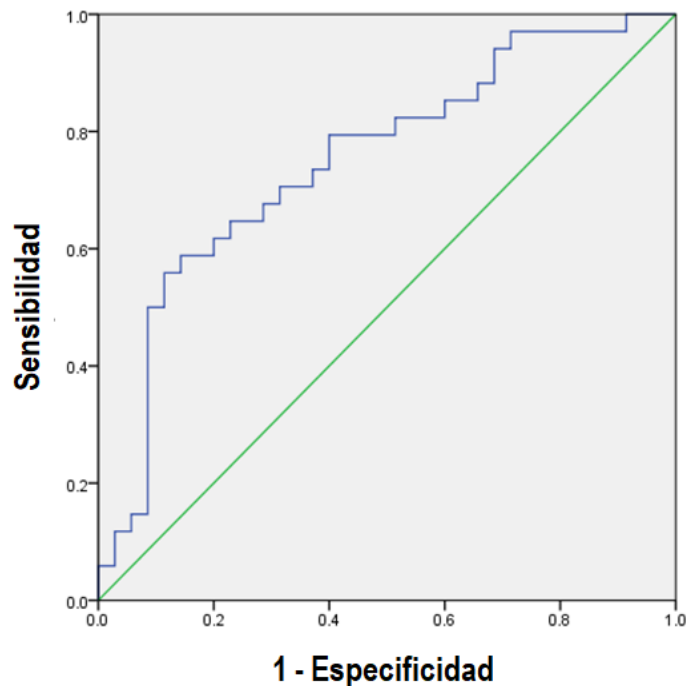


Figura 18. Curva ROC del IPT, donde el área bajo la curva (AUC) es 0.75.

Por último, realizamos una representación de diferentes puntos de corte del IPT como biomarcador predictor de HVI y calculamos, para cada uno de ellos, la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo, valor predictivo positivo, razón de verosimilitud positiva y razón de verosimilitud negativa (Tabla 21).

Si establecemos un punto de corte del IPT de 12 para el diagnóstico de la HVI, tendríamos una sensibilidad del 70.6% y una especificidad del 68.6%. Además, tendríamos un valor predictivo positivo del 68.6%, es decir, del total de pacientes con resultado positivo para HVI, el 68.6% serán pacientes enfermos, y un valor predictivo negativo del 70.6%, es decir, del total de pacientes con resultado negativo para HVI, el 70.6% serán pacientes sanos. Por último, la razón de verosimilitud nos indica cuánto es más probable obtener un determinado resultado positivo o negativo en presencia de HVI. Para este nivel de corte, sería 2.25 veces más probable encontrar un resultado positivo en el grupo de pacientes con HVI que en el grupo de pacientes sanos y sería

0.43 veces más probable encontrar un resultado negativo en los pacientes sanos que en los pacientes con HVI.

Tabla 21. Representación de los niveles de corte del IPT como biomarcador de HVI.

Valor de corte del IPT (x10 ³)	Sensibilidad % (IC 95%)	Especificidad % (IC 95%)	VPP % (IC 95%)	VPN % (IC 95%)	RV+ (IC 95%)	RV- (IC 95%)
8	94.1 (80.3 - 99.3)	28.6 (14.6 - 46.3)	56.1 (42.4 - 69.3)	83.3 (51.6 - 97.9)	1.32 (1.05 - 1.65)	0.21 (0.049 - 0.87)
10	82.4 (65.5 - 93.2)	42.9 (26.3 - 60.6)	58.3 (43.2 - 72.4)	71.4 (47.8 - 88.7)	1.44 (1.04 - 2.00)	0.41 (0.18 - 0.94)
12	70.6 (52.5 - 84.9)	68.6 (50.7 - 83.1)	68.6 (50.7 - 83.1)	70.6 (52.5 - 84.9)	2.25 (1.32 - 3.84)	0.43 (0.24 - 0.76)
14	58.8 (40.7 - 75.4)	85.7 (69.7 - 95.2)	80.0 (59.3 - 93.2)	68.2 (52.4 - 81.4)	4.12 (1.74 - 9.72)	0.48 (0.31 - 0.73)
16	29.4 (15.1 - 47.5)	91.4 (76.9 - 98.2)	76.9 (46.2 - 95.0)	57.1 (43.2 - 70.3)	3.43 (1.03 - 11.4)	0.77 (0.61 - 0.98)
18	11.8 (3.3 - 27.5)	94.3 (80.8 - 99.3)	66.7 (22.3 - 95.7)	52.4 (39.4 - 65.1)	2.06 (0.40 - 10.5)	0.94 (0.81 - 1.08)

Representamos los niveles de corte y su correspondiente sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), razón de verosimilitud positiva (RV+) y razón de verosimilitud negativa (RV-).

4.5 Indicador global de estrés oxidativo en la hipertrofia ventricular izquierda

4.5.1 Estandarización de los parámetros originales y normalizados

Para el cálculo del OXY-SCORE en ambos grupos (grupo control y grupo HVI) se han incluido los biomarcadores plasmáticos prooxidantes (carbonilos, MDA) y los biomarcadores plasmáticos antioxidantes (Tioles totales, GSH, actividad SOD, actividad catalasa, TAC).

Una vez comprobada la distribución normal de los mismos, se ha procedido a su estandarización de forma individual con los siguientes resultados en el grupo control (Tabla 22) y en el grupo HVI (Tabla 23).

Tabla 22. Estandarización y sumatorio (Σ) de los biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo y de defensa antioxidante en el grupo control (n=35).

MDA	Carbonilos	Tioles	GSH	SOD	Catalasa	TAC
-0,94921121	-1,24633055	1,35538424	-0,69608597	0,43819526	0,49712545	1,43437209
-1,61047343	-0,862725243	-0,87696524	-0,46730224	0,22321646	0,28687064	-0,07198856
-1,55580909	-2,045508274	1,01022279	-6,16693581	3,47093194	3,12531056	-4,75304478
-0,28794898	-2,045508274	-0,30576886	0,03941136	-0,26048585	0,28687064	-0,2177654
0,92436509	0,296082457	0,00782915	-6,16693581	2,49584951	0,89135322	-0,71988562
-2,88362363	0,999358854	0,82949667	-6,16693581	2,5419164	1,23301728	-0,91425473
-2,88362363	0,076308583	-0,17951511	-0,26299743	-0,06854049	-0,21248453	-0,88185988
-0,45370538	0,240140016	-0,7008209	1,42877824	-1,16390867	0,23430694	1,15901584
-0,61858009	-0,790799248	-0,23958746	1,46963921	-1,06665636	2,59967354	-0,34734481
-1,44559871	-1,486083867	-1,2669264	0,66051682	-0,79537358	-0,10735712	-4,75304478
-1,00475723	-0,886700575	1,08302233	-0,82685989	0,09269361	0,49712545	-0,86566245
-1,55580909	-0,658934923	-0,28387809	-1,65236431	1,57963033	0,4708436	0,83506731
-0,67412612	0,128255135	1,28563923	-1,97106099	2,19641475	1,83749986	2,26044083
0,86881906	-2,045508274	0,15393732	-0,22213647	-0,22209678	-0,89581266	-4,75304478
-0,12307427	-2,045508274	-1,08620027	2,00902274	-5,04120493	-0,42273934	1,32099011
0,48352361	0,699667207	3,4726799	-1,97925202	2,17849985	1,20673543	-0,13677827
-1,27984232	-1,150429223	-0,57405807	1,17542144	-0,85423683	0,62853471	0,38153938
0,59373398	-1,126453892	-0,72423893	-0,30385839	0,03894891	0,12917954	-1,59454664
0,64839832	-2,045508274	-1,43543442	-0,92496386	0,85279724	2,12660022	-0,80087275
0,04268213	0,519852219	0,00782915	0,56862673	-0,53176862	-1,028536	2,29283569
0,42797758	1,50284082	-0,34598679	0,40264084	-0,47546465	-1,05876013	2,35762539
-1,16963195	0,052333251	-0,57303989	2,93978652	-5,04120493	-1,06927287	-0,05579114
-1,05942158	0,376000229	0,24099131	0,54490101	-0,82608484	-1,16441317	0,15477541
-0,56391575	1,007350631	-0,78227493	-0,11894841	-0,13508155	-1,19963085	2,08226914
-0,56391575	0,212168796	-0,58118529	1,80951956	-5,04120493	-2,26246891	-0,7684779
0,75860869	0,312066011	0,55204388	0,8295155	-0,89006663	-2,26246891	0,49492136
-2,88362363	0,45991389	-0,14998803	0,86105565	-1,0001153	-2,26246891	-0,81707017
1,36520657	0,851510975	0,70375201	-0,39556018	0,19762374	-0,98543377	0,6406982
0,48352361	1,410935382	0,96542308	0,14184621	-0,21441896	-0,94522254	-0,81707017
-2,88362363	-2,045508274	1,8486902	-0,12685699	-0,12740373	-0,81959529	-0,39593709
0,31776721	1,247103948	1,68680032	-0,89351786	0,6403777	-1,14549024	-0,78467532
1,03457546	0,284094791	-0,24722378	0,84533265	-0,70068054	-1,05797168	1,48296437
0,97902944	-0,547050042	-0,30882339	1,92814817	-5,04120493	-2,26246891	0,44632908
-2,88362363	-0,075535185	1,25611214	-0,73544054	0,407484	-0,90553694	-0,60650363
-1,50026306	-0,72686503	1,31363905	0,79788121	-0,73906961	-0,70237823	0,72168533
$\Sigma =$	-0,62588547	-0,318713549	0,20318791	-0,33217055	-0,36804837	-0,19198468

MDA: Malondialdehído; GSH: Glutacion reducido; SOD: Superóxido dismutasa; TAC: Capacidad antioxidante total.

Tabla 23. Estandarización y sumatorio (Σ) de los biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo y de defensa antioxidante en el grupo HVI (n=35).

	MDA	Carbonilos	Tioles	GSH	SOD	Catalasa	TAC
	-0,67412612	-2,045508274	-0,50940393	-0,87572357	0,55592175	0,68109841	0,60830335
	0,86881906	-0,451148715	-0,60816694	0,442372	-0,59063187	-0,73812155	-0,94664959
	-0,12307427	-0,595000705	-1,2669264	-0,36731528	0,1387605	0,02405213	-0,68749076
	0,48352361	-0,75483625	-3,77774684	-1,56301626	-5,04120493	-2,26246891	-1,06003157
	-1,27984232	-0,666926701	-0,40300461	0,66833125	-0,62902094	0,99648062	-0,50931907
	0,59373398	-1,098482671	-1,78517766	-6,16693581	-1,70903349	0,26058879	-0,10438341
	0,64839832	-1,19038811	-1,07194582	-6,16693581	-1,23556827	-0,47530304	0,17097283
	0,04268213	-0,734856807	-0,59187614	-6,16693581	-0,99755603	0,5234073	-0,34734481
	0,42797758	-1,174404555	-0,78074766	0,92253539	-0,88750736	1,02276247	-0,2177654
	-1,16963195	-0,423177495	-1,89870421	-0,19784585	-0,03015142	1,02276247	1,32099011
	-1,05942158	0,995362965	-3,77774684	-1,2109906	-5,04120493	-2,26246891	0,89985702
	-0,56391575	-0,127481737	-0,42642264	0,39529716	-0,51897227	-2,26246891	-1,18961098
	-0,56391575	-1,230346996	-0,42438629	0,35001116	-0,49082028	0,94391692	-1,18961098
	0,75860869	0,643724767	-0,40504096	-0,94944277	0,70947803	-0,39645748	-0,10438341
	-2,88362363	-0,431169272	-0,03595239	-0,08317153	-0,27072293	0,18174324	-1,70792862
	1,36520657	-1,150429223	-0,96707376	0,47259405	-0,53688717	-0,10735712	0,46252651
	0,48352361	-2,045508274	-1,04089147	0,37449008	-0,50105736	0,20802509	0,34914452
	-2,88362363	-2,045508274	-0,6468576	0,47259405	-0,62134312	0,5234073	1,013239
	0,31776721	-1,206371664	-0,16424248	-0,58169411	-0,09157393	-0,18620268	-0,5255165
	1,03457546	-1,030552565	-0,3948592	-6,16693581	-0,92333716	0,99648062	0,0899857
	0,97902944	0,539831663	0,35757239	0,562507	-0,77489941	1,02276247	1,11042356
	-2,88362363	1,259091614	0,08979227	-0,81452628	0,46890652	-1,63932622	-0,86566245
	-1,50026306	0,655712432	-0,38518654	0,26038066	-0,39356796	-1,53446164	-0,81707017
	-2,88362363	2,038289895	-3,77774684	-0,34029432	0,08245653	-0,14362608	0,89985702
	-2,88362363	1,870462573	0,63909787	-0,56154608	0,33326513	-0,53995639	-0,41213452
	-2,88362363	1,498844931	-0,25078739	0,43427513	-0,62390239	-0,22930491	0,43013166
	-2,88362363	1,454890156	-0,73136616	-1,43101841	0,85791578	-0,10998531	-1,7565209
	0,92436509	0,140242801	0,60549809	0,0707632	-0,39100869	-0,75757012	-1,06003157
	-1,05942158	0,543827551	2,05436162	-0,65644896	0,2104201	-1,21802815	-4,75304478
	0,48352361	0,180201687	1,14054924	0,7425212	-0,63669875	-0,68976294	-1,1410187
	0,64839832	0,252127682	0,16106454	-0,44301162	0,06966017	-0,43456617	0,3329471
	1,03457546	0,17220991	2,02076184	0,58444388	-0,70068054	0,26321698	-0,31494996
	-0,0128639	1,107247846	0,78927874	-0,98842074	0,69156313	-1,04719612	-4,75304478
	-2,88362363	1,886446127	-0,18053329	-0,92515216	0,73507075	-0,75389066	-4,75304478
	0,31776721	-2,045508274	-3,77774684	-1,63833601	1,41839623	-2,26246891	-4,75304478
$\Sigma =$	-0,56179971	-0,148831199	-0,63493041	-0,90121662	-0,49615819	-0,32515107	-0,79086846

MDA: Malondialdehído; GSH: Glutation reducido; SOD: Superóxido dismutasa; TAC: Capacidad antioxidante total.

4.5.2 Cálculo del indicador global de estrés oxidativo (OXY-SCORE)

Tras estandarizar los parámetros de forma individual hemos calculado el OXY-SCORE (índice global de estrés oxidativo) en el grupo control y en el grupo de pacientes con hipertrofia ventricular izquierda. El cálculo del OXY-SCORE se realiza con la ecuación:

$$\text{OXY-SCORE} = \sum \text{antioxidantes} - \sum \text{daño oxidativo}$$

Los resultados numéricos del OXY-SCORE se reflejan en la Figura 19.

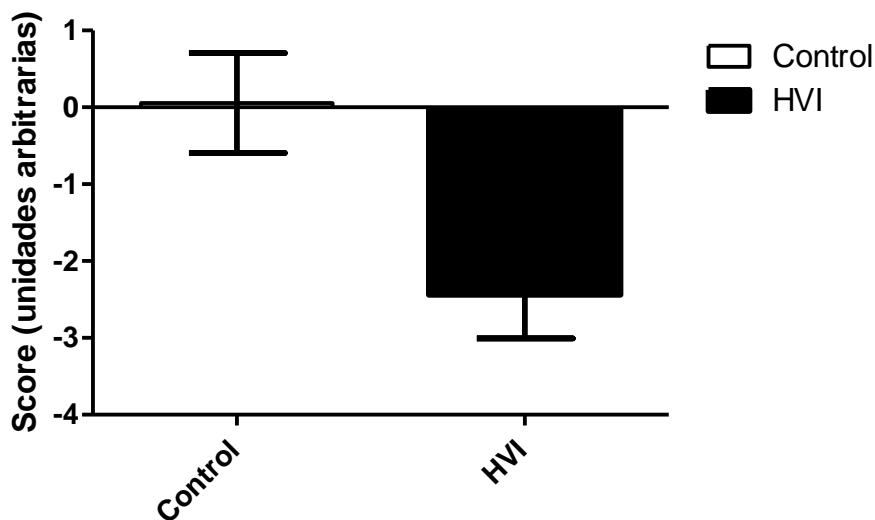


Figura 19. Índice global del estrés oxidativo en la hipertrofia ventricular izquierda.

El grupo control muestra un valor del OXY-SCORE próximo a cero (0,05586649 ± 0,65), expresado como media ± SEM, lo que indica un equilibrio entre los sistemas de defensa antioxidante y el daño oxidativo. Sin embargo, en el grupo HVI el valor del OXY-SCORE es negativo (-2,43769382 ± 0,57), mostrando un predominio del daño oxidativo. Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el OXY-SCORE entre ambos grupos de estudio (p = 0.005).

5

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran un indicador integral (OXY-SCORE) que tiene en cuenta tanto el daño oxidativo como el sistema de defensa antioxidante en los pacientes con HVI. Este indicador podría, en un futuro, servir como diagnóstico de la HVI, como diana terapéutica en la búsqueda de nuevos tratamientos y como herramienta para el seguimiento de las diferentes terapias que produzcan regresión de la HVI. También proponemos el IPT, que tiene en cuenta tanto el daño oxidativo como la defensa antioxidante, como nuevo biomarcador de estrés oxidativo en los pacientes con HVI. Hasta el momento actual, no existen en la literatura trabajos similares (o no hemos sido capaces de encontrarlos) que estudien el estrés oxidativo en los pacientes con HVI teniendo en cuenta el daño oxidativo y la defensa antioxidante. Para llegar a estos resultados, hemos realizado un estudio en seres humanos, observacional, prospectivo, comparando dos grupos. En el grupo control se han incluido pacientes sin HVI y en el grupo experimental se han incluido pacientes con HVI.

A continuación, analizaremos los resultados obtenidos en el presente estudio.

5.1 La hipertrofia ventricular izquierda es un problema en la práctica clínica

Las estimaciones sobre la prevalencia de la HVI indican que es una patología sobre la que debemos realizar un minucioso despistaje en pacientes con HTA, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardiaca, valvulopatías y otras enfermedades cardiovasculares¹⁻⁵.

En una primera fase, el aumento de la masa del VI constituye un mecanismo de adaptación frente a la carga hemodinámica del ventrículo. Sin embargo, el aumento de la masa del VI es la expresión más importante de la remodelación cardíaca y supone un estado patológico que está directamente relacionado con complicaciones cardiovasculares¹⁶⁻¹⁹. La HVI es un factor de riesgo de morbimortalidad independiente y es considerado como daño de órgano diana que empeora el pronóstico de los pacientes⁵⁸.

En la literatura (estudios en seres humanos y en modelos animales) encontramos estudios sobre la regresión de la HVI tras tratamientos crónicos con fármacos antihipertensivos y su implicación en el pronóstico de los pacientes⁶⁸⁻⁷⁹. Desde hace diez años, nuestro grupo de investigación desarrolla una línea de investigación centrada en la búsqueda de nuevas terapias que produzcan regresión de la HVI tras tratamientos de corta duración^{93,177}. El esmolol, β -bloqueante cardiosselectivo, produjo disminución de la masa del ventrículo izquierdo estudiada mediante ecocardiografía transtorácica, revirtió el metabolismo de la glucosa del ventrículo izquierdo estudiado mediante estudio PET/TC y disminuyó el área del cardiomiocito estudiado mediante técnicas de histología tras 48 horas de tratamiento en un modelo experimental de rata con hipertrofia ventricular izquierda secundaria a la hipertensión arterial esencial (SHR, *spontaneously hypertensive rat*)⁹³. La dronedarona, bloqueante multicanal, produjo similar efecto tras dos semanas de tratamiento en la SHR¹⁷⁷.

La literatura nos muestra que la regresión de la HVI es un factor determinante en el pronóstico de los pacientes⁶⁸⁻⁷⁰, por lo que es importante contar con un método diagnóstico óptimo en nuestra práctica clínica diaria.

5.2 Los métodos diagnósticos en la hipertrofia ventricular izquierda son insuficientes

El hecho de que la prevalencia de la HVI varíe en función del método diagnóstico utilizado se debe a la variabilidad en la sensibilidad y especificidad de las pruebas de las que disponemos.

La electrocardiografía es la prueba complementaria más accesible y rentable para el diagnóstico de algunas patologías cardíacas debido a su bajo coste e inocuidad. Sin embargo, en la práctica disponemos de numerosos criterios diagnósticos que ofrecen distinta sensibilidad y especificidad^{44,45} y que en ningún caso son suficientes para el cribado de la HVI en fases tempranas.

La ecocardiografía es una prueba que, a diferencia del ECG, presenta elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la HVI. Sin embargo, es una herramienta menos accesible y presenta importantes limitaciones como la ventana acústica del paciente o la reproducibilidad (variabilidad interobservador e intraobservador)⁵⁰⁻⁵².

La resonancia magnética cardíaca es una prueba de imagen más precisa, reproducible y con menos variabilidad que la ecocardiografía^{54,55}, siendo una herramienta útil en el ámbito de la investigación clínica. Sin embargo, presenta limitaciones considerables como un elevado coste o el empleo de mayor tiempo para adquirir y analizar datos que dificultan su uso rutinario en la clínica⁵⁶.

A nivel biomolecular, se ha intentado validar la utilización de análisis bioquímicos para el diagnóstico de la HVI. El péptido natriurético cerebral N-terminal (NT-proBNP) ha sido objeto de varios estudios, encontrándose resultados contradictorios que impiden su recomendación para el uso de forma rutinaria en el cribado de la HVI⁴⁶⁻⁴⁸. En este sentido, la heterogeneidad de las

poblaciones incluidas (incluso pacientes con insuficiencia cardiaca o fibrilación auricular asociadas), el tipo de péptido natriurético analizado, el criterio para calcular la masa del ventrículo izquierdo y el método para confirmar la HVI (ecocardiografía o resonancia magnética cardiaca), podrían explicar la discrepancia en los resultados de los diferentes estudios. La mayor parte de los estudios (incluido el nuestro) han evaluado la HVI mediante ecocardiografía. Sin embargo, hemos encontrado un estudio en el que se reclutaron 27 pacientes de forma consecutiva, que muestra una correlación entre el NT-proBNP y la masa del ventrículo izquierdo calculada mediante resonancia magnética ($r = 0,59$) y un área bajo la curva ROC para la detección de HVI de 0,87 (IC 95%, 0.73 - 1; $p < 0.05$), lo que mostraría la posibilidad de diagnóstico de HVI mediante la determinación de NT-proBNP¹⁷⁸. Sin embargo, únicamente participaron en este estudio pacientes con hipertensión arterial y función sistólica conservada. Los mismos autores, en un estudio posterior con 336 pacientes, 94 de ellos con HVI, muestran la superioridad del NT-proBNP (sensibilidad del 76% y especificidad del 65%) frente al ECG (sensibilidad del 25% y especificidad del 94%) en la detección de HVI, diagnosticada por ecocardiografía, en pacientes hipertensos sin fibrilación auricular, valvulopatía ni disfunción sistólica⁴⁶, lo que permitiría seleccionar mejor a los candidatos a la realización del estudio ecocardiográfico. Otros autores no muestran resultados similares en la cuantificación del péptido natriurético tipo B (BNP) y su correlación con la HVI en los pacientes con HTA: área bajo la curva ROC para la detección de HVI de 0,58 (IC 95%, 0,52 - 0,64), sensibilidad del 50% y especificidad del 69%⁴⁸. Por último, en el *Dallas Heart Study*, ni el BNP ni el NT-pro-BNP discriminaron a los pacientes con HVI o disfunción sistólica⁴⁷. No

olvidemos la variabilidad del valor del NT-proBNP en el diagnóstico de la HVI con respecto al sexo, mostrando mayor sensibilidad en la mujer (88%) que en el hombre (62%)¹⁷⁹.

A pesar de que las guías de práctica clínica reconocen que la HVI es un daño de órgano diana que influye en el pronóstico de los pacientes, no disponemos de un método diagnóstico óptimo y los algoritmos de tratamiento de la HTA siguen sin incorporar la HVI o la masa del VI en la toma de decisiones en la práctica clínica⁵⁸.

Por lo anteriormente descrito, es necesario encontrar un método diagnóstico accesible, coste-efectivo, poco invasivo, reproducible y que presente una sensibilidad y especificidad adecuadas desde fases iniciales de la HVI.

5.3 Los biomarcadores de estrés oxidativo ofrecen ventajas para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares

La utilización de los biomarcadores de estrés oxidativo/nitrosativo en la práctica clínica surge tras el hallazgo de que existe un incremento del estrés y daño oxidativos en condiciones patológicas. Estos biomarcadores pueden ser medidos y utilizados como indicadores de enfermedades cardiovasculares como la HVI, así como indicadores de la respuesta biológica al tratamiento de las patologías con las que están vinculados.

Hasta el momento actual, no hemos encontrado estudios que vinculen biomarcadores de estrés oxidativo con la HVI en la práctica clínica. Por ello, nuestro grupo de investigación plantea como objetivo la búsqueda de biomarcadores que puedan relacionarse con el inicio y progresión de la HVI, siendo específicos para el estudio de esta patología. Además, buscamos moléculas que sean estables y accesibles en el plasma de nuestros pacientes

de forma cuantitativa, así como reproducibles, coste-efectivas y con una sensibilidad adecuada para el diagnóstico de la HVI.

La elección de los biomarcadores plasmáticos empleados en este trabajo se realizó teniendo en cuenta estudios que han mostrado una buena correlación de los mismos en el plasma y en corazón¹⁵⁶. Analizamos en el plasma de los pacientes con y sin HVI los siguientes biomarcadores: capacidad antioxidante total, tioles totales, glutatión reducido, actividad superóxido dismutasa y actividad catalasa (biomarcadores de defensa antioxidante), carbonilos, malondialdehído y proteínas tioladas (biomarcadores de daño oxidativo).

Previamente, nuestro grupo de investigación ha estudiado estos biomarcadores en un modelo de rata hipertensa (SHR) que desarrolla HTA e HVI, resultando de gran utilidad en la línea de investigación que desarrollamos desde hace varios años buscando nuevas terapias que produzcan regresión del remodelado cardiovascular. El esmolol (fármaco antiarrítmico y antihipertensivo) produjo regresión de la HVI y del remodelado vascular (de las arterias coronaria y aorta) tras 48 h de tratamiento. El estrés oxidativo es uno de los posibles mecanismos implicados en este efecto^{94,169,180}.

Por último, recientemente se ha avanzado en el diseño del OXY-SCORE, agrupando biomarcadores de daño oxidativo y de defensa antioxidante. En nuestro estudio, hemos recurrido al diseño de un OXY-SCORE de HVI para mejorar el rendimiento y aumentar la sensibilidad que nos ofrecen los biomarcadores analizados de forma individual.

A continuación, analizaremos los resultados obtenidos en el presente trabajo en lo referente a los parámetros de estrés oxidativo:

La distribución de las variables demográficas, clínicas y analíticas no mostró diferencias estadísticamente significativas, evidenciando que la distribución de ambos grupos es homogénea. Las diferencias encontradas en ambos grupos en variables ecocardiográficas son esperables. Las variables ecocardiográficas relacionadas con la HVI (MVIsc, PPVId, SIVd) mostraron diferencias estadísticamente significativas, estando aumentadas en el grupo HVI.

Lo descrito anteriormente refuerza el valor del análisis y comparación de los biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo (carbonilos, MDA, proteínas tioladas) y de los biomarcadores plasmáticos de defensa antioxidante (GSH, actividad SOD, actividad catalasa, TAC, tioles totales).

En primer lugar, la concentración plasmática de carbonilos, la concentración plasmática de MDA y la concentración de proteínas tioladas fueron mayores en el grupo HVI, sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas para las dos primeras variables. En segundo lugar, la concentración plasmática de GSH, la actividad SOD, la actividad catalasa, la TAC y los tioles totales están aumentados en el grupo control pero tampoco encontramos significación estadística en estas diferencias.

En la misma línea de estudios previos basados en la medición individual de biomarcadores de daño oxidativo y defensa antioxidante, en nuestro estudio no encontramos la significación estadística suficiente en ninguno de ellos debido a que sólo describen parcialmente el estado oxidativo y presentan alta variabilidad intra e intersujetos^{165,168}. Esta evidencia respalda la necesidad de buscar y utilizar parámetros o indicadores globales que integren a los biomarcadores de daño oxidativo y de defensa antioxidantes. Por ello, profundizamos en el análisis de las diferencias entre el grupo control y el grupo

HVI mediante el estudio del índice de proteínas tioladas y el diseño de un OXY-SCORE en la HVI.

5.4 El índice de proteínas tioladas: biomarcador plasmático de hipertrofia ventricular izquierda

La concentración de proteínas tioladas fue mayor en el grupo HVI. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en los tioles totales al comparar ambos grupos (HVI/control). El índice de proteínas tioladas (IPT) es el ratio entre proteínas tioladas/tioles totales, es decir, es el ratio entre biomarcador asociado a oxidación/biomarcador asociado a la capacidad antioxidante. En la última década, se ha propuesto y validado el IPT como nuevo biomarcador de estrés oxidativo¹⁴¹. Se ha asociado a determinadas patologías en las que se sospecha un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes^{141,173}. La alcaptonuria es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por un trastorno del metabolismo de la tirosina y la fenilalanina en la que el estrés oxidativo está presente. Aunque el tamaño muestral es pequeño, un estudio mostró un IPT elevado de forma significativa en pacientes con alcaptonuria (11 pacientes) con respecto al grupo control (11 pacientes)¹⁴¹. El IPT elevado también se ha relacionado con los pacientes que presentan insuficiencia renal crónica con necesidad de hemodiálisis (20 pacientes) con respecto a los pacientes sanos (grupo control de 20 pacientes)¹⁷³. Este estudio también ha mostrado un descenso de los niveles de IPT en plasma tras la hemodiálisis. Por lo tanto, el IPT no sólo sirve para el diagnóstico de una patología sino también para el seguimiento del tratamiento administrado a los pacientes con dicha patología.

En nuestro estudio, encontramos un aumento del índice de proteínas tioladas, a favor del grupo HVI, con diferencias significativas. Adicionalmente, el análisis de regresión logística mostró una asociación positiva entre el IPT y la HVI (OR = 1.24 [IC 95%, 1.05 - 1.47]) y reflejó que el IPT es una variable independiente del sexo, edad, hábito tabáquico, HTA, DM, DL, ERC (sin necesidad de hemodiálisis) y patología coronaria y/o vascular.

Los resultados obtenidos sugieren que el IPT puede ser un biomarcador de estrés oxidativo útil en el diagnóstico de la HVI pero necesitamos analizar su sensibilidad y especificidad para avanzar en esa línea. El diseño de la curva ROC nos permite conocer la idoneidad del IPT como prueba diagnóstica, resultando el AUC 0.75. Podemos inferir que, si escogemos al azar un paciente con HVI y un paciente sin HVI, tenemos un 75% de probabilidad de encontrar un valor de IPT mayor en el paciente con HVI.

Adicionalmente, hemos representado y calculado distintos valores de corte del IPT y su correspondiente sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo, valor predictivo positivo, razón de verosimilitud positiva y razón de verosimilitud negativa. Consideramos que el valor de corte óptimo del IPT para el diagnóstico de la HVI es 12. Si utilizamos ese valor de corte, obtenemos una sensibilidad del 70.6%, una especificidad del 68.6%, un valor predictivo positivo del 68.6% y un valor predictivo negativo del 70.6%. Además, obtenemos una razón de verosimilitud positiva del 2.25 y una razón de verosimilitud negativa del 0.43. Es decir, para un valor de corte de 12, sería 2.25 veces más probable encontrar un IPT >12 en el grupo de pacientes con HVI que en el grupo de pacientes sanos y sería 0.43 veces más probable encontrar un IPT <12 en los pacientes sanos que en los pacientes con HVI.

En resumen, el IPT es un parámetro que refleja el desequilibrio de un biomarcador de estrés oxidativo y un biomarcador de defensa antioxidante, independiente de las principales variables demográficas y clínicas, y con una buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la HVI. Este es el primer estudio que relaciona el IPT con la HVI.

5.5 El OXY-SCORE en la hipertrofia ventricular izquierda: desequilibrio entre los sistemas de defensa antioxidante y daño oxidativo a favor del último

En 2006, Dean P. Jones redefinió el estrés oxidativo como el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, en favor de los primeros, que conduce a una ruptura del control y señalización fisiológica que normalmente ejerce el sistema redox, conduciendo a un daño molecular⁹⁸. Se han propuesto numerosos indicadores para medir el status prooxidante o antioxidante en diversas patologías, pero ninguno de ellos puede ser considerado como *gold standard* para medir el estrés oxidativo o cambios en el *status* oxidativo. Los estudios basados en la medida individual de estos indicadores arrojan resultados contradictorios, dado que sólo describen parcialmente el *status* oxidativo y suelen mostrar alta variabilidad intra e intersujetos. Debido a ello, recientemente se ha propuesto el uso de un indicador integral que tiene en cuenta la naturaleza multifactorial del estrés oxidativo y que se ha denominado OXY-SCORE. En 2010, Veglia *et al.*¹⁶⁴ definen un indicador global de estrés oxidativo u OXY-SCORE que reúne mediciones de daño oxidativo y mediciones de defensas antioxidantes. En la literatura encontramos diversos estudios tanto en seres humanos como en modelo animal en los que se ha diseñado y

calculado un OXY-SCORE para mostrar el estrés oxidativo en determinadas enfermedades cardiovasculares: el OXYVen permitió establecer diferencias significativas entre pacientes con insuficiencia venosa y controles sanos¹⁷⁶; el OXY-SCORE permitió establecer diferencias significativas entre los pacientes sometidos a cirugía cardíaca con y sin circulación extracorpórea¹⁶⁸; el OXY-SCORE permitió establecer diferencias significativas en los pacientes con insuficiencia renal con y sin albuminuria¹⁸¹; El OXY-SCORE permitió estudiar el estrés oxidativo en un modelo de rata con hipertrofia ventricular desarrollada tras un periodo de restricción alimentaria fetal¹⁸².

Los estudios disponibles sugieren que el OXY-SCORE aumenta la sensibilidad que ofrecen los biomarcadores de estrés oxidativo cuando son utilizados de forma individual.

En nuestro estudio, definimos un OXY-SCORE adaptado a la HVI en el que, de forma análoga al OXY-SCORE de Veglia *et al.*, diseñamos dos indicadores parciales: el *Damage Score* (DS), que resume el componente de daño (carbonilos, MDA); y el *Protection Score* (PS), que resume las defensas antioxidantes (tioles totales, GSH, actividad SOD, actividad catalasa, TAC). Tras normalizar y estandarizar los parámetros, calculamos nuestro OXY-SCORE restando el DS del PS y generando un número que refleja el equilibrio entre los sistemas oxidante y antioxidante.

En primer lugar, el OXY-SCORE del grupo control presenta un valor próximo a cero. Esto sugiere que, en los pacientes sin HVI, existe un equilibrio entre los sistemas de defensa antioxidante y el daño oxidativo que se refleja en los biomarcadores analizados. En segundo lugar, el OXY-SCORE del grupo HVI presenta un valor negativo, reflejando un predominio del estrés oxidativo y de

los biomarcadores de daño oxidativo. Por último, se han encontrado diferencias significativas en el OXY-SCORE entre ambos grupos de estudio, confirmando nuestra hipótesis de que utilizando un indicador global de estrés oxidativo conseguimos aumentar la sensibilidad y mejorar el rendimiento que nos ofrecen los biomarcadores de forma individual.

5.6 Dónde estamos y perspectivas futuras

Antes de desarrollar este trabajo, nuestro grupo de investigación ha desarrollado estudios en modelo animal con HVI en los que analizamos biomarcadores de daño oxidativo, biomarcadores antioxidantes y su posible utilidad como futuras dianas terapéuticas en la HVI^{94,169}. Este trabajo supone el primer estudio clínico que analiza y relaciona los biomarcadores de estrés oxidativo con la HVI en seres humanos. Por ello, es el punto de partida para trasladar nuestra línea de investigación al ámbito clínico.

En el presente estudio, hemos analizado biomarcadores de daño oxidativo y biomarcadores antioxidantes en pacientes con y sin HVI. El estudio nos ha permitido evaluar la eficacia de los biomarcadores de estrés oxidativo, del índice de proteínas tioladas y del OXY-SCORE para el diagnóstico de la HVI en seres humanos. Tanto el IPT como el OXY-SCORE diseñado para el diagnóstico de la HVI ofrecen ventajas interesantes frente a otras pruebas diagnósticas disponibles en la práctica clínica.

Tras validar la utilidad del IPT y el OXY-SCORE, el siguiente paso será analizar su posible rendimiento como dianas terapéuticas en la HVI y utilizar estos índices como guía para estudiar la regresión de la HVI tras instaurar un tratamiento. Para ello, sería necesario estudiar la correlación que pueda tener

la regresión ecocardiográfica con la disminución del IPT o los cambios en el OXY-SCORE de pacientes hipertensos tras iniciar un tratamiento.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado estudios experimentales en un modelo de rata hipertensa (SHR)^{93,94,177} que sugieren que un β -bloqueante β_1 -selectivos (esmolol) y un bloqueante multicanal (dronedarona) reducen la masa del VI tras tratamiento de corta duración (48 horas y 2 semanas respectivamente). Este trabajo abre la puerta a futuros estudios que analicen los efectos de ambos fármacos antiarrítmicos sobre los parámetros de estrés oxidativo (IPT y OXY-SCORE) en la rata SHR y su posterior traslado a los seres humanos, estrechando lazos entre la investigación básica y la clínica.

5.7 Limitaciones y fortalezas del estudio

En primer lugar, enumeramos las limitaciones que encontramos en nuestro estudio:

- La evidencia sobre la fisiopatología de la HVI nos dice que existen distintos estímulos que originan diferentes patrones de HVI (concéntrica/excéntrica). Estos patrones han demostrado tener distintas implicaciones pronósticas¹⁸³. Sin embargo, en la práctica clínica habitual el tipo de HVI no suele ser objeto de análisis y tampoco ha sido objeto de análisis en nuestro estudio.

- La HVI se clasifica, según las últimas Guías de Práctica Clínica de la *American Society of Echocardiography* y la *European Association of Cardiovascular Imaging*, en leve, moderada y grave. Los límites que establece esta clasificación han variado con los años y es posible que varíen en el futuro. Por ello, en nuestro estudio no hemos diferenciado los pacientes con HVI leve, moderada y grave ni su relación con los niveles de biomarcadores.

- Se han descrito múltiples biomarcadores de estrés oxidativo relacionados con enfermedades cardiovasculares. Diseñar y realizar un estudio que analizase todos los biomarcadores existentes en la actualidad supondría una complejidad y gastos inasumibles. Por ello, en nuestro estudio nos hemos basado en publicaciones previas para seleccionar un número limitado de biomarcadores plasmáticos que han demostrado tener buena correlación con la patología cardíaca¹⁵⁶.

- Los pacientes incluidos en el estudio pertenecen a una población determinada. Son pacientes ingresados en la planta de Cirugía Cardiovascular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón pendientes de cirugía. Esto nos ha permitido disponer de estudios ecocardiográficos detallados que especifiquen la existencia o no de hipertrofia ventricular izquierda y permitan la clasificación de los pacientes en dos grupos. Sin embargo, al haber acotado nuestra selección a pacientes ingresados y no realizar una distribución aleatorizada, podemos cometer un sesgo de selección. Por ello, hemos realizado un análisis exhaustivo de las características de los grupos de estudio, comprobando su homogeneidad.

En segundo lugar, las fortalezas que hemos observado en nuestro estudio son:

- Hemos diseñado y realizado un estudio clínico complejo e innovador, analizando por primera vez la asociación entre el IPT y la HVI en seres humanos.

- Además de realizar un análisis de los biomarcadores presentes en el plasma de los sujetos, se ha optimizado el estudio realizando un análisis de

indicadores globales (índice de proteínas tioladas y OXY-SCORE) que tienen en cuenta la naturaleza del estrés oxidativo.

- Los resultados obtenidos nos permiten recomendar el IPT como parámetro útil en el diagnóstico de la HVI, siendo independiente de las principales variables clínicas estudiadas y ofreciendo una buena sensibilidad y especificidad. Proponemos el IPT como prueba diagnóstica para la HVI por ser una prueba accesible, de bajo coste, poco invasiva y reproducible. También podría ser útil como monitorización del paciente que sigue un tratamiento para la HVI y como diana terapéutica en la terapia farmacológica.

- El análisis del OXY-SCORE nos indica que hay un aumento del daño oxidativo en los pacientes con HVI, a diferencia de los pacientes sanos, por lo que es una herramienta que puede ser útil en el diagnóstico y como diana terapéutica de la HVI. Para ello, necesitamos futuros estudios en el ámbito de la práctica clínica que refuercen y amplíen nuestros resultados.

6

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten realizar las siguientes conclusiones:

- El estudio del estado oxidativo del paciente con HVI ha permitido diseñar y calcular un indicador integral que tiene en cuenta tanto el daño oxidativo como el sistema de defensa antioxidante.
- El análisis de los biomarcadores prooxidantes plasmáticos (carbonilos, malondialdehído) no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con HVI y los pacientes sin HVI. Las proteínas tioladas muestran una elevación estadísticamente significativa en los pacientes con HVI con respecto a los pacientes sin HVI.
- El análisis de los biomarcadores antioxidantes plasmáticos (capacidad antioxidante total, tioles totales, glutatión reducido, actividad superóxido dismutasa y actividad catalasa) no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con HVI y los pacientes sin HVI.
- El índice de proteínas tioladas (IPT) presenta una elevación estadísticamente significativa en los pacientes con HVI con respecto a los pacientes sin HVI.
- El indicador global de estrés oxidativo (OXY-SCORE), calculado a partir de los biomarcadores individuales (carbonilos, malondialdehído, capacidad antioxidante total, tioles totales, glutatión reducido, actividad superóxido dismutasa y actividad catalasa), muestra un predominio del daño oxidativo en los pacientes con HVI con respecto a los pacientes sin HVI.

7

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Liebson PR, Grandits G, Prineas R, Dianzumba S, Flack JM, Cutler JA, et al. Echocardiographic correlates of left ventricular structure among 844 mildly hypertensive men and women in the Treatment of Mild Hypertension Study (TOMHS). *Circulation*. 1993; 87:476-486.
2. Levy D, Anderson KM, Savage DD, Kannel WB, Christiansen JC, Castelli WP. Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med*. 1988; 108:7-13.
3. Cuspidi C, Rescaldani M, Sala C, Negri F, Grassi G, Mancia G. Prevalence of electrocardiographic left ventricular hypertrophy in human hypertension: an updated review. *J Hypertens*. 2012; 30:2066-2073.
4. Cuspidi C, Sala C, Negri F, Mancia G, Morganti A. Prevalence of left-ventricular hypertrophy in hypertension: an updated review of echocardiographic studies. *J Hum Hypertens*. 2012; 26:343-349.
5. Messerli FH, Sundgaard-Riise K, Reisin ED, Dreslinski GR, Ventura HO, Oigman W, et al. Dimorphic cardiac adaptation to obesity and arterial hypertension. *Ann Intern Med*. 1983; 99:757-761.
6. Shapiro LM, Mackinnon J, Beevers DG. Echocardiographic features of malignant hypertension. *Heart*. 1981; 46:374-379.
7. Thompson JA, Hays PM, Sagar KB, Cruickshank DP. Echocardiographic left ventricular mass to differentiate chronic hypertension from preeclampsia during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1986; 155:994-999.

8. Hammond IW, Devereux RB, Alderman MH, Laragh JH. Relation of blood pressure and body build to left ventricular mass in normotensive and hypertensive employed adults. *J Am Coll Cardiol.* 1988; 12:996-1004.
9. Lauer MS, Anderson KM, Kannel WB, Levy D. The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. *JAMA.* 1991; 266:231-236.
10. Schmieder RE, Messerli FH. Does obesity influence early target organ damage in hypertensive patients? *Circulation.* 1993; 87:1482-1488.
11. Vensel LA, Devereux RB, Pickering TG, Herrold EM, Borer JS, Laragh JH. Cardiac structure and function in renovascular hypertension produced by unilateral and bilateral renal artery stenosis. *Am J Cardiol.* 1986; 58:575-582.
12. Fouad-Tarazi F, Imamura M, Bravo EL, Rossi GP, Nagi HK, Lin WW, et al. Differences in left ventricular structural and functional changes between pheochromocytoma and essential hypertension: role of circulating catecholamines. *Am J Hypertens.* 1992; 5:134-140.
13. Schmieder RE, Messerli FH, Garavaglia GE, Nunez BD. Dietary salt intake. A determinant of cardiac involvement in essential hypertension. *Circulation.* 1988; 78:951-956.
14. Garavaglia GE, Messerli FH, Schmieder RE, Nunez BD, Oren S. Sex differences in cardiac adaptation to essential hypertension. *Eur Heart J.* 1989; 10:1110-1114.
15. Kupari M, Koskinen P, Virolainen J. Correlates of left ventricular mass in a population sample aged 36 to 37 years. *Circulation.* 1994; 89:1041-1050.

16. Morales C, Hita A, Gelpi RJ. Fisiología integrada de la hipertrofia cardíaca. *Rev Argent Cardiol.* 1999; 67:377-388.
17. Díez J, Laviades C, Varo N, Querejeta R, López B. Diagnóstico bioquímico de la fibrosis miocárdica hipertensiva. *Rev Esp Cardiol.* 2000; 53:8-13.
18. Hess OM, Schneider J, Kock R, Bamert C, Grimm J, Krayenbuehl HP. Diastolic function and myocardial structure in patients with myocardial hypertrophy. *Circulation.* 1981; 63:360-371.
19. McLenachan JM, Dargie HJ. Ventricular arrhythmias in hypertensive left ventricular hypertrophy: relationship to coronary artery disease, left ventricular dysfunction and myocardial fibrosis. *Am J Hypertens.* 1990; 3:735-740.
20. Kozàkovà M, Palombo C, Pratali L, Pittella G, Galetta F, L'Abatte A. Mechanisms of coronary flow reserve impairment in human hypertension. An integrated approach by transthoracic and transesophageal echocardiography. *Hypertension.* 1997; 29:551-559.
21. Devereux RB, Pickering TG, Harshfield GA, Kleinert HD, Denby L, Clark L, et al. Left ventricular hypertrophy in patients with hypertension: importance of blood pressure response to regularly recurring stress. *Circulation.* 1983; 68:470-476.
22. Prisant LM, Carr AA. Ambulatory blood pressure monitoring and echocardiographic left ventricular wall thickness and mass. *Am J Hypertens.* 1990; 3:81-89.

23. Ravogli A, Trazzi S, Villani A, Mutti E, Cuspidi C, Sampieri L, et al. Early 24-hour blood pressure elevation in normotensive subjects with parental hypertension. *Hypertension*. 1990; 16:491-497.
24. Ganau A, Devereux RB, Pickering TG, Roman MJ, Schnall PL, Santucci S, et al. Relation of left ventricular hemodynamic load and contractile performance to left ventricular mass in hypertension. *Circulation*. 1990; 81:25-36.
25. Devereux RB, Savage DD, Sachs I, Laragh JH. Relation of hemodynamic load to left ventricular hypertrophy and performance in hypertension. *Am J Cardiol*. 1983; 51:171-176.
26. Schmieder RE, Schobel HP, Messerli FH. Central blood volume: a determinant of early cardiac adaptation in arterial hypertension? *J Am Coll Cardiol*. 1995; 26:1692-1698.
27. Roman MJ, Saba PS, Pini R, Spitzer M, Pickering TG, Rosen S, et al. Parallel cardiac and vascular adaptation in hypertension. *Circulation*. 1992; 86:1909-1918.
28. Devereux RB, Drayer JI, Chien S, Pickering TG, Letcher RL, DeYoung JL, et al. Whole blood viscosity as a determinant of cardiac hypertrophy in systemic hypertension. *Am J Cardiol*. 1984; 54:592-595.
29. de Simone G, Devereux RB, Chien S, Alderman MH, Atlas SA, Laragh JH. Gender differences in left ventricular anatomy, blood viscosity and volume regulatory hormones in normal adults. *Am J Cardiol*. 1991; 68:1704-1708.

30. Harshfield GA, Grim CE, Hwang C, Savage DD, Anderson SJ. Genetic and environmental influences on echocardiographically determined left ventricular mass in black twins. *Am J Hypertens.* 1990; 3:538-543.
31. Verhaaren HA, Schieken RM, Mosteller M, Hewitt JK, Eaves LJ, Nance WE. Bivariate genetic analysis of left ventricular mass and weight in pubertal twins (the Medical College of Virginia twin study). *Am J Cardiol.* 1991; 68:661-668.
32. Dunn FG, Oigman W, Sungaard-Riise K, Messerli FH, Ventura H, Reisin E, et al. Racial differences in cardiac adaptation to essential hypertension determined by echocardiographic indexes. *J Am Coll Cardiol.* 1983; 1:1348-1351.
33. Koren MJ, Mensah GA, Blake J, Laragh JH, Devereux RB. Comparison of left ventricular mass and geometry in black and white patients with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 1993; 6:815-823.
34. Alderman EL, Harrison DC. Myocardial hypertrophy resulting from low dosage isoproterenol administration in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1971; 136:268-270.
35. Laks MM, Morady F, Swan HJC. Myocardial hypertrophy produced by chronic infusion of subhypertensive dose of norepinephrine in the dog. *Chest.* 1973; 64:75-78.
36. Mann DL, Kent RL, Parsons B, Cooper G. Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation.* 1992; 85:790-804.
37. Everett AD, Tufro-McReddie A, Fisher A, Gomez RA. Angiotensin receptor regulates cardiac hypertrophy and transforming growth factor- β 1 expression. *Hypertension.* 1994; 23:587-592.

38. Nagano M, Higaki J, Mikami H, Nakamaru M, Higashimori K, Katahira K, et al. Converting enzyme inhibitors regressed cardiac hypertrophy and reduced tissue angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1991; 9:595-599.
39. Schmieder RE, Messerli FH, Garavaglia GE, Nunez B, MacPhee AA, Re RN. Does the renin-angiotensin-aldosterone system modify cardiac structure and function in essential hypertension? *Am J Med.* 1988; 84:136-139.
40. Schlaich MP, Schobel HP, Langenfeld MR, Hilgers K, Schmieder RE. Inadequate suppression of angiotensin II modulates left ventricular structure in humans. *Clin Nephrol.* 1998; 49:153-159.
41. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res.* 1990; 67:1355-1364.
42. Brilla CG, Weber KT. Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat. *Cardiovasc Res.* 1992; 26:671-677.
43. Schlaich MP, Schobel H, Hilgers K, Schmieder RE. Impact of aldosterone on left ventricular structure and function in normotensive and mildly hypertensive subjects. *Am J Cardiol.* 2000; 85:1199-1206.
44. Cabezas M, Comellas A, Gómez JR, López Grillo L, Casal H, Carrillo N, et al. Comparación de la sensibilidad y especificidad de los criterios electrocardiográficos para la hipertrofia ventricular izquierda según métodos de Romhilt-Estes, Sokolow-Lyon, Cornell y Rodríguez Padial. *Rev Esp Cardiol.* 1997; 50:31-35.

45. Nadour W, Biederman, RW. Is left ventricular hypertrophy regression important? Does the tool used to detect it matter? JCH. 2009; 11:441-447.
46. Andrade H, Morillas P, Castillo J, Roldán J, Mateo I, Agudo P, et al. Validez diagnóstica del NT-proBNP frente al electrocardiograma en la detección de hipertrofia ventricular izquierda de origen hipertensivo. Rev Esp Cardiol. 2011; 64:939-941.
47. de Lemos JA, McGuire DK, Khera A, Das SR, Murphy SA, Omland T, et al. Screening the population for left ventricular hypertrophy and left ventricular systolic dysfunction using natriuretic peptides: results from the Dallas Heart Study. Am Heart J. 2009; 157:746-753.
48. Nakamura M, Tanaka F, Yonezawa S, Satou K, Nagano M, Hiramori K. The limited value of plasma B-type natriuretic peptide for screening for left ventricular hypertrophy among hypertensive patients. Am J Hypertens. 2003; 16:1025-1029.
49. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. J Am Soc Echocardiogr. 2015; 28:1-39.
50. Armstrong AC, Gidding S, Gjesdal O, Wu C, Bluemke DA, Lima JA. LV mass assessed by echocardiography and CMR, cardiovascular outcomes, and medical practice. JACC: Cardiovascular Imaging. 2012; 5:837-848.
51. Qi X, Cogar B, Hsiung MC, Nanda NC, Miller AP, Yelamanchili P, et al. Live/real time three-dimensional transthoracic echocardiographic assessment

- of left ventricular volumes, ejection fraction, and mass compared with magnetic resonance imaging. *Echocardiography*. 2007; 24:166-173.
52. Takeuchi M, Nishikage T, Mor-Avi V, Sugeng L, Weinert L, Nakai H, et al. Measurement of left ventricular mass by real-time three-dimensional echocardiography: validation against magnetic resonance and comparison with two-dimensional and m-mode measurements. *J Am Soc Echocardiogr*. 2008; 21:1001-1005.
53. Hlatky MA, Greenland P, Arnett DK, Ballantyne CM, Criqui MH, Elkind MS, et al. Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2009; 119:2408-2416.
54. Germain P, Roul G, Kastler B, Mossard JM, Bareiss P, Sacrez A. Inter-study variability in left ventricular mass measurement. Comparison between M-mode echocardiography and MRI. *Eur Heart J*. 1992; 13:1011-1019.
55. Bottini PB, Carr AA, Prisant LM, Flickinger FW, Allison JD, Gottdiener JS. Magnetic resonance imaging compared to echocardiography to assess left ventricular mass in the hypertensive patient. *Am J Hypertens*. 1995; 8:221-228.
56. Hendel RC, Patel MR, Kramer CM, Poon M, Hendel RC, Carr JC, et al. ACCF/ACR/SCCT/SCMR/ASNC/NASCI/SCAI/SIR 2006 appropriateness criteria for cardiac computed tomography and cardiac magnetic resonance imaging: a report of the American College of Cardiology Foundation Quality Strategic Directions Committee Appropriateness Criteria Working Group, American College of Radiology, Society of Cardiovascular Computed

- Tomography, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance, American Society of Nuclear Cardiology, North American Society for Cardiac Imaging, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Interventional Radiology. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48:1475-1497.
57. Dewey FE, Rosenthal D, Murphy DJ Jr, Froelicher VF, Ashley EA. Does size matter? Clinical applications of scaling cardiac size and function for body size. *Circulation*. 2008; 117:2279-2287.
58. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 24430.
59. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 1990; 322:1561-1566.
60. Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med*. 1991; 114:345-352.
61. Cooper RS, Simmons BE, Castaner A, Santhanam V, Ghali J, Mar M. Left ventricular hypertrophy is associated with worse survival independent of ventricular function and number of coronary arteries severely narrowed. *Am J Cardiol*. 1990; 65:441-445.

62. Ghali JK, Liao Y, Simmons B, Castaner A, Cao G, Cooper RS. The prognostic role of left ventricular hypertrophy in patients with or without coronary artery disease. *Ann Intern Med.* 1992; 117:831-836.
63. Verdecchia P, Porcellati C, Reboldi G, Gattobigio R, Borgioni C, Pearson TA, et al. Left ventricular hypertrophy as an independent predictor of acute cerebrovascular events in essential hypertension. *Circulation.* 2001; 104:2039-2044.
64. Bang CN, Soliman EZ, Simpson LM, Davis BR, Devereux RB, Okin PM. Electrocardiographic Left Ventricular Hypertrophy Predicts Cardiovascular Morbidity and Mortality in Hypertensive Patients: The ALLHAT Study. *Am J Hypertens.* 2017; 30:914-922.
65. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. The prognostic importance of left ventricular geometry in uremic cardiomyopathy. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 5:2024-2031.
66. Aronow WS, Ahn C, Kronzon I, Königsberg M. Congestive heart failure, coronary events, and atherothrombotic brain infarction in elderly blacks and whites with systemic hypertension and with and without echocardiographic and electrocardiographic evidence of left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol.* 1991; 67:295-299.
67. Yurenev AP, Dyakonova HG, Novikov ID, Vitols A, Pahl L, Haynemann G, et al. Management of essential hypertension in patients with different degrees of left ventricular hypertrophy: Multicenter Trial. *Am J Hypertens.* 1992; 5:S182-S189.

68. Muiesan ML, Salvetti M, Rizzoni D, Castellano M, Donato F, Agabiti-Rosei E. Association of change in left ventricular mass with prognosis during long-term antihypertensive treatment. *J Hypertens*. 1995; 13:1091-1095.
69. Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Gattobigio R, Zampi I, et al. Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation*. 1998; 97:48-54.
70. Koren MJ, Ulin RJ, Koren AT, Laragh JH, Devereux RB. Left ventricular mass change during treatment and outcome in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2002; 15:1021-1028.
71. Mathew J, Sleight P, Lonn E, Johnstone D, Pogue J, Yi Q, et al. Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. *Circulation*. 2001; 104:1615-1621.
72. Fagard RH, Staessen JA, Thijs L, Celis H, Birkenhager WH, Bulpitt CJ, et al. Prognostic significance of electrocardiographic voltages and their serial changes in elderly with systolic hypertension. *Hypertension*. 2004; 44:459-464.
73. Bang CN, Devereux RB, Okin PM. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy or strain is associated with lower incidence of cardiovascular morbidity and mortality in hypertensive patients independent of blood pressure reduction - A LIFE review. *J Electrocardiol*. 2014; 47:630-635.
74. Okin PM, Devereux RB, Jern S, Kjeldsen SE, Julius S, Nieminen MS, et al. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during

- antihypertensive treatment and the prediction of major cardiovascular events. JAMA. 2004; 292:2343-2349.
75. Devereux RB, Wachtell K, Gerdts E, Boman K, Nieminen MS, Papademetriou V, et al. Prognostic significance of left ventricular mass during treatment of hypertension. JAMA. 2004; 292:2350-2356.
76. Gonzalez-Fernandez RA, Rivera M, Rodriguez PJ, Fernandez Martinez J, Soltero LH, Diaz LM, et al. Prevalence of ectopic ventricular activity after left ventricular mass regression. Am J Hypertens. 1993; 6:308-313.
77. Rials SJ, Wu Y, Xu X, Filart R, Marinchak RA, Kowey PR. Regression of left ventricular hypertrophy with captopril restores normal ventricular action potential duration, dispersion of refractoriness, and vulnerability to inducible ventricular fibrillation. Circulation. 1997; 96:1330-1336.
78. Okin PM, Devereux RB, Harris KE, Jern S, Kjeldsen SE, Julius S, et al. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy is associated with less hospitalization for heart failure in hypertensive patients. Ann Intern Med. 2007; 147:311-319.
79. Pierdomenico SD, Cuccurullo F. Risk reduction after regression of echocardiographic left ventricular hypertrophy in hypertension: a meta-analysis. Am J Hypertens. 2010; 23:876-881.
80. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J. 2013; 34:2159-2219.

81. MacMahon SW, Macdonald GJ, Bernstein L, Andrews G, Blacket RB. Comparison of weight reduction with metoprolol and treatment of hypertension in young overweight patients. *Lancet*. 1985; 8840:1233-1236.
82. MacMahon SW, Wilcken DEL, Mcdonald GJ. The effect of weight reduction on left ventricular mass: a randomized controlled trial in young, overweight hypertensive patients. *N Engl J Med*. 1986; 314:334-339.
83. Liebson PR, Grandits GA, Dianzumba S, Prineas RJ, Grimm RH, Neaton JD, et al. Comparison of five antihypertensive monotherapies and placebo for change in left ventricular mass in patients receiving nutritional hygienic therapy in the Treatment of Mild Hypertension Study (TOMHS). *Circulation*. 1995; 91:698-706.
84. Manolio TA, Levy D, Garrison RJ, Castelli WP, Kannel WB. Relation of alcohol intake to left ventricular mass: The Framingham Study. *J Am Coll Cardiol*. 1991; 17:717-721.
85. Cruickshank J, Lewis J, Moore V, Dodd C. Reversibility of left ventricular hypertrophy by differing types of antihypertensive therapy. *J Hum Hypertens*. 1992; 6:85-90.
86. Dahlöf B, Pennert K, Hansson L. Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients: a metaanalysis of 109 treatment studies. *Am J Hypertens*. 1992; 5:95-110.
87. Schmieder RE, Martus P, Klingbeil A. Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension: a meta-analysis of randomized double-blind studies. *JAMA*. 1996; 275:1507-1513.

88. Schmieder RE, Schlaich MP, Klingbeil A, Martus P. Update on reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension (a meta-analysis of all randomized double-blind studies until December 1996). *Nephrol Dial Transplant.* 1998; 13:564-569
89. Jennings G, Wong J. Regression of left ventricular hypertrophy in hypertension: changing patterns with successive meta-analyses. *J Hypertens.* 1998; 16:S29-S34.
90. Klingbeil AU, Schneider M, Martus P, Messerli FH, Schmieder RE. A meta-analysis of the effects of treatment on left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Med.* 2003; 115:41-46.
91. Fagard RH, Celis H, Thijs L, Wouters S. Regression of left ventricular mass by antihypertensive treatment: a meta-analysis of randomized comparative studies. *Hypertension.* 2009; 54:1084-1091.
92. Aronow WS, Fleg JL, Pepine CJ, Artinian NT, Bakris G, Brown AS, et al. ACCF/AHA 2011 expert consensus document on hypertension in the elderly: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents developed in collaboration with the American Academy of Neurology, American Geriatrics Society, American Society for Preventive Cardiology, American Society of Hypertension, American Society of Nephrology, Association of Black Cardiologists, and European Society of Hypertension. *J Am Soc Hypertens.* 2011; 5:259-352.
93. Quintana-Villamandos B, Delgado-Martos MJ, Sánchez-Hernández JJ, Gómez de Diego JJ, Fernández-Criado MC, Canillas F, et al. Early regression of left ventricular hypertrophy after treatment with esmolol in an

- experimental rat model of primary hypertension. *Hypertens Res.* 2013; 36:408-413.
94. Quintana-Villamandos B, Goukassian DA, Sasi SP, Delgado-Baeza E. Short-Term Treatment with Esmolol Reverses Left Ventricular Hypertrophy in Adult Spontaneously Hypertensive Rats via Inhibition of Akt/NF- κ B and NFATc4. *BioMed Res Int.* 2018; 2018:2691014.
95. Ca Lar N, Dincer I. Comparison between nebivolol and ramipril in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy: a randomized open blinded end-point (PROBE) trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011; 15:1359-1368.
96. Xing F, Chen J, Zhao B, Jiang J, Tang A, Chen Y. Real role of β -blockers in regression of left ventricular mass in hypertension patients: Bayesian network meta-analysis. *Medicine.* 2017; 96:e6290.
97. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. En: Sies H, editor. *Oxidative Stress.* Londres: Academic Press. 1985; 1-8.
98. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8:1865-1879.
99. Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev.* 1997; 55:S44-S49.
100. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; 141:312-322.
101. Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7:1302-1314.

102. Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, del Razo LM, Quintanilla-Vega B, et al. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 21:66-85.
103. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*. 2002; 33:774-797.
104. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000; 87:840-844.
105. Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*. 2008; 23:381-390.
106. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Investig*. 2003; 111:1201-1209.
107. Burcham PC, Kuhan YT. Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malondialdehyde. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 220:996-1001.
108. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004; 142:231-255.
109. Kohen R, Nyska A. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002; 30:620-650.
110. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodríguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med*. 2002; 32:1102-1115.

111. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog.* 2006; 5:14.
112. Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem.* 2002; 269:1996-2002.
113. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008; 4:89-96.
114. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol.* 2008; 585:325-337.
115. Kohen R, Nyska A. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30:620-650.
116. Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, Chevanne M, Vincent S, Sergent O, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2003; 89:14-20.
117. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* 1999; 31:273-300.
118. Wallenberg M, Olm E, Hebert C, Björnstedt M, Fernandes AP. Selenium compounds are substrates for glutaredoxins: a novel pathway for selenium metabolism and a potential mechanism for selenium-mediated cytotoxicity. *Biochem J.* 2010; 429:85-93.

119. Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr.* 2000; 130:S1447-S1454.
120. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.* 2004; 10:1677-1694.
121. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem.* 2009; 390:191-214.
122. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39:44-84.
123. Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med.* 1993; 14:615-631.
124. Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol Biochem.* 2002; 40:537-548.
125. Diplock AT, Charuleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr.* 1998; 80:S77-S112.
126. Flora SJ. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Med Cell Longev.* 2009; 2:191-206.
127. Polidori MC, Stahl W, Eichler O, Niestroj I, Sies H. Profiles of antioxidants in human plasma. En: *Bio-Assays for Oxidative Stress Status.* 2001; 229-235.

128. Lowe F. Biomarkers of oxidative stress. En: Leher, editor. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg. 2014; 65-87.
129. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. 2006; 52:601-623.
130. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28:1685-1696.
131. Duncan MW. A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids*. 2003; 25:351-361.
132. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res*. 2003; 42:318-343.
133. Winczura A, Zdżalik D, Tudek B. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. *Free Radic Res*. 2012; 46:442-459.
134. van't Erve TJ, Lih FB, Kadiiska MB, Deterding LJ, Eling TE, Mason RP. Reinterpreting the best biomarker of oxidative stress: The 8-iso-PGF₂α/PGF₂α ratio distinguishes chemical from enzymatic lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*. 2015; 83:245-251.
135. Jones DP, Liang Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47:1329-1338.
136. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004; 134:489-492.

137. Moran LK, Gutteridge J, Quinlan GJ. Thiols in cellular redox signalling and control. *Curr Med Chem*. 2001; 8:763-772.
138. Engel RH, Evens AM. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front Biosci*. 2006; 11:300-312.
139. Giustarini D, Dalle-Donne I, Lorenzini S, Milzani A, Rossi R. Age-related influence on thiol, disulfide, and protein-mixed disulfide levels in human plasma. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006; 61:1030-1038.
140. Dalle-Donne I, Milzani A, Gagliano N, Colombo R, Giustarini D, Rossi R. Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10:445-474.
141. Giustarini D, Dalle-Donne I, Lorenzini S, Selvi E, Colombo G, Milzani A, et al. Protein thiolation index (PTI) as a biomarker of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2012; 53:907-915.
142. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003; 25:207-218.
143. Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. En: *Stress Response*. Humana Press. 2000; 15-24.
144. Kroese LJ, Scheffer PG. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and cardiovascular disease: a systematic review. *Curr Atheroscler Rep*. 2014; 16:452.
145. Laher I. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*, 1^a Ed. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg. 2014.

146. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*. 2009; 390:191-214.
147. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28:625-635.
148. Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37:2466-2471.
149. Johnson RM, Ho YS, Yu DY, Kuypers FA, Ravindranath Y, Goyette GW. The effects of disruption of genes for peroxiredoxin-2, glutathione peroxidase-1, and catalase on erythrocyte oxidative metabolism. *Free Radic Biol Med*. 2010; 48:519-525.
150. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001; 54:176-186.
151. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev*. 1970; 50:319-375.
152. Fredenburgh LE, Merz AA, Cheng S. Haeme oxygenase signalling pathway: implications for cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2015; 36:1512-1518.
153. Maeda H, Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochem (Mosc)*. 1998; 63:854-865.
154. Radi R, Denicola A, Alvarez B, Ferrer-Sueta G, Rubbo H. The biological chemistry of peroxynitrite. *En: Nitric oxide*. 2000; 57-82.

155. Biomarkers Definitions Working Group, Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69:89-95.
156. Veskokoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kouretas D. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radic Biol Med.* 2009; 10:1371-1374.
157. Moriarty-Craige SE, Jones DP. Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2004; 24:481-509.
158. Ashfaq S, Abramson JL, Jones DP, Rhodes SD, Weintraub WS, Hooper WC, et al. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47:1005-1011.
159. Przemysław W, Piotr K, Grażyna C, Danuta KP, Małgorzata I, Bernadeta M, et al. Total, free, and protein-bound thiols in plasma of peritoneal dialysis and predialysis patients. *Int Urol Nephrol.* 2011; 43:1201-1209.
160. Raijmakers MT, Roes EM, Zusterzeel PL, Steegers EA, Peters WH. Thiol status and antioxidant capacity in women with a history of severe pre-eclampsia. *BJOG.* 2004; 111:207-212.
161. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004; 65:1009-1016.

162. Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol.* 2015; 31:631-641.
163. Rossi WM, Garrido G, Sellés AJN. Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante. *J Pharm Pharmacogn Res.* 2016; 1:62-83.
164. Veglia F, Cavalca V, Tremoli E. OXY-SCORE: A Global Index to Improve Evaluation of Oxidative Stress by Combining Pro-and Antioxidant Markers. *Methods Mol Biol.* 2010; 594:197-213.
165. Veglia F, Cighetti G, De Franceschi M, Zingaro L, Boccotti L, Tremoli E, et al. Age- and gender-related oxidative status determined in healthy subjects by means of OXYSCORE, a potential new comprehensive index. *Biomarkers.* 2006; 11:562-573.
166. Cavalca V, Sisillo E, Veglia F, Tremoli E, Cighetti G, Salvi L, et al. Isoprostanes and oxidative stress in off-pump and onpump coronary bypass surgery. *Ann Thorac Surg.* 2006; 81:562-567.
167. Gerritsen WB, van Boven WJ, Driessen AH, Haas FJ, Aarts LP. Off-pump versus onpump coronary artery bypass grafting: oxidative stress and renal function. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001; 20:923-929.
168. Veglia F, Werba J, Tremoli E, Squellerio I, Sisillo E, Parolari A, et al. Assessment of oxidative stress in coronary artery bypass surgery: comparison between the global index OXY-SCORE and individual biomarkers. *Biomarkers.* 2009; 14:465-472.
169. Arnalich-Montiel A, González MC, Delgado-Baeza E, Delgado-Martos MJ, Condezo-Hoyos L, Martos-Rodríguez A, et al. Short-term esmolol improves

- coronary artery remodeling in spontaneously hypertensive rats through increased nitric oxide bioavailability and superoxide dismutase activity. *BioMed Res Int.* 2014; 2014:531087.
170. Campos C, Guzman R, Lopez-Fernandez E, Casado A. Evaluation of the copper (II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: the CUPRACBCS assay. *Anal Biochem.* 2009; 392:37-44.
171. Hissin PJ, Hilf R.A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976; 74:214-226.
172. Saleh L, Plieth CA. Coelenterazine-Based Luminescence Assay to Quantify High-Molecular-Weight Superoxide Anion Scavenger Activities. *Nat Protoc.* 2010; 5:1635-1641.
173. Colombo G, Reggiani F, Podestà MA, Garavaglia ML, Portinaro NM, Milzani A, et al. Plasma protein thiolation index (PTI) as a biomarker of thiol-specific oxidative stress in haemodialyzed patients. *Free Radic Biol Med.* 2015; 89:443-451.
174. Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues JV, Marcos JC. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem.* 2014; 458:69-71.
175. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186:407-421.

176. Condezo-Hoyos L, Rubio M, Arribas SM, España-Caparrós G, Rodríguez-Rodríguez P, Mujica-Pacheco E, et al. A plasma oxidative stress global index in early stages of chronic venous insufficiency. *J Vasc Surg.* 2013; 57:205-213.
177. Quintana-Villamandos B, Gomez de Diego JJ, Delgado-Martos MJ, Muñoz-Valverde D, Soto-Montenegro ML, Desco M, et al. Dronedarone produces early regression of myocardial remodelling in structural heart disease. *PLoS One.* 2017; 21;12:e0188442.
178. Morillas P, Castillo J, Quiles J, Nuñez D, Guillén S, Maceira A, et al. Usefulness of NT-proBNP level for diagnosing left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. A cardiac magnetic resonance study. *Rev Esp Cardiol.* 2008; 61:972-975.
179. Mouly-Bertin C, Bissery A, Milon H, Dzudie A, Rabilloud M, Bricca G, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide – a promising biomarker for the diagnosis of left ventricular hypertrophy in hypertensive women. *Arch Cardiovasc Dis.* 2008; 101:307-315.
180. Quintana-Villamandos B, González MC, Delgado-Martos MJ, Condezo-Hoyos L, Böger RH, Lüneburg N, et al. Short-term esmolol attenuates remodeling of the thoracic aorta in hypertensive rats by decreasing concentrations of ADMA down-regulated by oxidative stress. *Eur J Pharmacol.* 2016; 791:502-509.
181. Ruiz-Hurtado G, Condezo-Hoyos L, Pulido-Olmo H, Aranguéz I, del Carmen González M, Arribas S, et al. Development of albuminuria and

enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression. *J Hypertens* 2014; 32:2082-2091.

182. Rodríguez-Rodríguez P, de Pablo AL, Condezo-Hoyos L, Martín-Cabrejas MA, Aguilera Y, Ruiz-Hurtado G, et al. Fetal undernutrition is associated with perinatal sex-dependent alterations in oxidative status. *J Nutr Biochem*. 2015; 26:1650-1659.

183. Oktay AA, Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO, Gilliland YE, Shah S, et al. Current Perspectives on Left Ventricular Geometry in Systemic Hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*. 2016; 59:235-246.

8

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

8.1 Índice de figuras

Número	Descripción	Página
Figura 1	La ley de Laplace-Young establece que la tensión parietal es proporcional de modo directo a la presión transmural (P) y al radio de la cavidad (r) e inversamente proporcional al espesor de la pared (e).	24
Figura 2	Esquema de los principales patrones de hipertrofia ventricular izquierda según el tipo de estímulo. La sobrecarga de presión produce un aumento del tamaño de los cardiomiocitos predominantemente en el grosor, dando lugar a una HVI concéntrica. La sobrecarga de volumen produce un aumento del tamaño de los cardiomiocitos predominantemente en longitud, originando una HVI excéntrica.	27
Figura 3	Cálculo de la masa del ventrículo izquierdo según el método lineal (adaptado de Lang <i>et al.</i> ⁴⁹ y Armstrong <i>et al.</i> ⁵⁰). IVS: septo interventricular; LVID: diámetro interno del ventrículo izquierdo; PWT: espesor de pared inferolateral.	31
Figura 4	Fórmula del grosor parietal relativo o cociente de masa respecto a volumen.	34
Figura 5	Patrones de geometría ventricular en función de la masa del ventrículo izquierdo indexada y el grosor parietal relativo (adaptado de Lang <i>et al.</i> ⁴⁹).	35
Figura 6	Abordaje de la hipertrofia ventricular izquierda mediante intervenciones no farmacológicas y farmacológicas.	40
Figura 7	Representación gráfica del estrés oxidativo.	45
Figura 8	Reacciones catalizadas por la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GRed) ¹¹⁷ .	50
Figura 9	Esquema de los criterios de validación y utilidad potencial de los biomarcadores de estrés oxidativo/nitrosativo (adaptado de Dalle-Donne <i>et al.</i> ¹²⁹).	53
Figura 10	El índice de proteínas tioladas es la relación molar entre la suma de los tioles de bajo peso molecular unidos covalentemente a proteínas plasmáticas y los tioles libres (adaptado de Dalle-Donne <i>et al.</i> ¹²⁹).	55

Figura 11	Estructuras químicas de los carbonilos que surgen de la oxidación directa de las cadenas laterales de aminoácidos ¹²⁹ .	56
Figura 12	Fórmula del OXY-SCORE	61
Figura 13	Equipo de ecocardiografía iE33 [®] .	71
Figura 14	Transductor S5-1.	72
Figura 15	Distribución de los niveles de biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo en el grupo control y en el grupo HVI. A) Niveles plasmáticos de carbonilos totales. B) Niveles plasmáticos de MDA.	96
Figura 16	Distribución de los niveles de biomarcadores plasmáticos de defensa antioxidante en el grupo control y en el grupo HVI. A) Concentración plasmática de GSH. B) Actividad SOD. C) Actividad catalasa. D) Capacidad antioxidante total (TAC).	97
Figura 17	Distribución de los niveles de los nuevos biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo en el grupo control y en el grupo HVI. A) Concentración plasmática de tioles totales. B) Concentración plasmática de proteínas tioladas. C) Índice de proteínas tioladas (IPT).	99
Figura 18	Curva ROC del IPT, donde el área bajo la curva (AUC) es 0.75.	101
Figura 19	Índice global del estrés oxidativo en la hipertrofia ventricular izquierda.	105

8.2 Índice de tablas

Número	Descripción	Página
Tabla 1	Principales características de los métodos diagnósticos de la hipertrofia ventricular izquierda.	29
Tabla 2	Principales criterios diagnósticos de hipertrofia ventricular izquierda por electrocardiografía.	30
Tabla 3	Rangos normales y de gravedad para la masa del ventrículo izquierdo (adaptado de Lang <i>et al.</i> ⁴⁹).	34
Tabla 4	Sensibilidad para detectar cambios inducidos por el tratamiento, tiempo de cambio y valor pronóstico del cambio (adaptado de Mancía <i>et al.</i> ⁸⁰).	39
Tabla 5	Especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno, especies reactivas de azufre y especies reactivas de cloro.	46
Tabla 6	Asociación entre biomarcadores de estrés oxidativo y enfermedades cardiovasculares (adaptado de Rossi <i>et al.</i> ¹⁶³).	60
Tabla 7	Composición del reactivo Amplex Red utilizado para medir la actividad catalasa (AR-CAT).	81
Tabla 8	Variables demográficas cuantitativas.	89
Tabla 9	Variable demográfica cualitativa.	89
Tabla 10	Variables cualitativas de antecedentes personales.	90
Tabla 11	Variables cualitativas de tratamientos farmacológicos.	91
Tabla 12	Variables ecocardiográficas cualitativas.	92
Tabla 13	Variables ecocardiográficas cuantitativas con distribución normal.	92
Tabla 14	Variables ecocardiográficas cuantitativas con distribución no normal.	92
Tabla 15	Variables bioquímicas con distribución normal.	94
Tabla 16	Variables bioquímicas con distribución no normal.	94

Tabla 17	Biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo.	95
Tabla 18	Biomarcadores plasmáticos de defensa antioxidante.	96
Tabla 19	Tioles totales, proteínas tioladas e índice de proteínas tioladas.	98
Tabla 20	Análisis de regresión logística.	100
Tabla 21	Representación de los niveles de corte del IPT como biomarcador de HVI.	102
Tabla 22	Estandarización y sumatorio (Σ) de los biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo y de defensa antioxidante en el grupo control (n=35).	103
Tabla 23	Estandarización y sumatorio (Σ) de los biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo y de defensa antioxidante en el grupo HVI (n=35).	104

9

ANEXOS

9.1 Dictamen favorable del Comité Ético de Investigación

Clínica



Hospital General Universitario
Gregorio Marañón

Comunidad de Madrid



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. Fernando Díaz Otero, Secretario del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**
HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN

CERTIFICA

Que se ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

TÍTULO: "A plasma oxidative stress global index in patients with left ventricular hypertrophy"

Protocolo sin versionar. Hoja de Información al paciente y Consentimiento Informado sin versionar.

Promotor: Investigador

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos legalmente establecidos, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIC actuando como comité evaluador, emite dictamen favorable y acepta que dicho estudio sea realizado en los centros siguientes por los investigadores principales que se relacionan a continuación:

Dra. María Begoña Quintana Villamandos / Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Y HACE CONSTAR QUE:

1º En la reunión celebrada el día **23 de noviembre de 2015, acta 12/2015** se decidió emitir el informe correspondiente al estudio de referencia.

2º En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente -Real Decreto 223/2004 y Decreto 39/94 de la Comunidad de Madrid- para que la decisión del citado CEIC sea válida.

3º El CEIC-A1, tanto en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ ICH/ 135/95)

4º La composición actual del CEIC-A1 es la siguiente:

- D. FELIPE ATIENZA FERNÁNDEZ (Cardiología - Presidente)
- D. ANDRÉS JESÚS MUÑOZ MARTÍN (Oncología Médica - Vicepresidente)
- D. FERNANDO DÍAZ OTERO (Neurología - Secretario)
- D. JUAN ANTONIO ANDUEZA LILLO (Medicina Interna)
- Dª. MARÍA LUISA BAEZA OCHOA DE OCÁRIZ (Alergología)
- Dª. DOROTEA BLANCO BRAVO (Pediatria)
- Dª MARÍA DEL CARMEN DE LA CRUZ ARGUEDAS (Unidad de Apoyo a la Investigación)
- D. RAFAEL CARRIÓN GALINDO (Oncología Médica)
- D. CARLOS MANUEL GONZÁLEZ FERNÁNDEZ (Reumatología)
- D. VICENTE DE LAS PEÑAS GIL (Psicología Clínica)
- D. EDUARDO FERNÁNDEZ-CRUZ PÉREZ (Inmunología)
- Dª. MARÍA DEL CARMEN HERAS ESCOBAR (Enfermería)
- Dª. LEONOR MARÍA LAREDO VELASCO (Farmacología Clínica)
- D. IGNACIO MARÍN JIMÉNEZ (Aparato Digestivo)
- Dª. CARMEN MATEO RUIZ (Farmacia Atención Primaria)
- Dª. MARÍA DE LOS ÁNGELES MUÑOZ FERNÁNDEZ (Inmunología)
- Dª. ANA MUR MUR (Farmacia Hospitalaria)
- Dª. MARÍA BEGOÑA QUINTANA VILLAMANDOS (Anestesiología y Reanimación)
- D. JOSÉ MIGUEL RIVAS BUENO (Licenciado en Derecho)

Lo que firmo en Madrid a 30 de noviembre de 2015



Fdo. Dr. Fernando Díaz Otero

422/15

C/ Dr. Esquerdo 46, Pabellón de Gobierno, Planta baja, 28007 Madrid
ceic.hguqm@salud.madrid.org Tel. 91 586 7007 - Fax. 91 400 8156

9.2 Consentimiento informado del paciente

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Título del estudio:

A plasma oxidative stress global index in patients with left ventricular hypertrophy

Investigador principal: Dra M^a Begoña Quintana Villamandos

Centro: Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Introducción:

Se le solicita participar en un estudio de investigación en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Gregorio Marañón. Antes de que decida si quiere participar, es importante que entienda por qué se está llevando a cabo dicho estudio. Si hay algún punto de este documento que no entienda, no le quede suficientemente claro o desee una información más detallada, consúltelo. Puede realizar todas las preguntas que desee, y el médico encargado de explicarle este documento está en la obligación de responder satisfactoriamente a todas ellas.

¿Por qué solicitan mi participación y cuál es el objetivo?

Solicitamos su participación en este estudio para que, mediante una muestra de sangre podamos estudiar más en profundidad una patología cardíaca (la hipertrofia ventricular izquierda) que tiene una alta incidencia en nuestra sociedad. El objetivo es estudiar a través de la muestra de sangre unos marcadores específicos que nos ayuden a conocer y diagnosticar esta patología, así como a establecer en un futuro nuevos tratamientos.

¿Tengo que participar?

Su participación es totalmente voluntaria, la decisión de no participar no afectará al tratamiento médico estándar. También es libre de cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

Si decide participar, se le pedirá que firme esta hoja de consentimiento informado.

Si usted no puede leer, es necesario un testigo imparcial (que no participe en la realización del estudio) para el procedimiento del consentimiento. El testigo estará durante la totalidad de dicho procedimiento para confirmar mediante su firma que se le ha facilitado una explicación precisa, ha tenido tiempo para considerar la información ha podido preguntar todas sus dudas, y se ha dado respuesta a todas ellas y usted está dando consentimiento voluntario para participar en este estudio.

¿Qué me ocurrirá si participo?

Si usted participa en este estudio se le extraerá una muestra adicional de sangre para analizar unos marcadores específicos. Estas extracciones de sangre se realizarán a través de un catéter previamente colocado en la práctica clínica habitual. El hecho de participar en el estudio no cambiará su tratamiento médico/quirúrgico para el que ha ingresado.

¿Qué están analizando?

Mediante la muestra de sangre queremos estudiar unos marcadores específicos de una patología cardíaca (hipertrofia ventricular izquierda) que nos ayudarán a conocer mejor esta patología, diagnosticarla y en un futuro estudiar nuevos tratamientos.

¿Cuáles son los efectos secundarios?

No se prevé ningún efecto secundario derivado del estudio puesto que sólo se trata de una muestra de sangre que se extraerá de un catéter colocado en la práctica clínica habitual en los pacientes que ingresan en la planta para ser intervenidos quirúrgicamente, por lo que no le producirá ninguna incomodidad adicional.

¿Qué beneficios obtendré si participo?

Usted no obtendrá ningún beneficio directo, sólo contribuirá a ampliar el conocimiento médico y poder mejorar en un futuro el tratamiento de una patología cardíaca (hipertrofia ventricular izquierda).

¿Se mantendrá confidencial mi participación y mis datos personales?

Toda la información obtenida durante el transcurso de este estudio es estrictamente confidencial. Su identidad se mantendrá oculta en todos los documentos recogidos relacionados con este estudio, incluyendo las muestras de laboratorio.

Su médico del estudio recogerá información acerca de usted. Esta información, en adelante denominada datos, se registrará sin su nombre en un formulario de recogida de datos. En estos formularios se sustituirá su nombre por un código. Todos los datos que se recojan se mantendrán confidenciales. Personal autorizado introducirá los datos en una base de datos informatizada. En ningún momento su identidad será revelada en trabajo, informe del estudio o publicación. Su médico del estudio mantendrá una lista confidencial que relaciona su nombre con su código y sólo personas autorizadas tendrán acceso a esta lista.

De acuerdo con la Ley vigente (Ley orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de protección de Datos de Carácter personal y sus reglamentos posteriores), tiene usted derecho a acceder a cualquier información inicial y actualizada sobre sus datos registrados, así como a la modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias, al Comité de ética de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal. Sus datos serán revisados sólo por personal cualificado y autorizado.

¿Quién financiará este estudio?

Este estudio no está financiado por ninguna empresa. Ni usted ni los médicos participantes en el mismo obtendrá una compensación económica.

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL REPRESENTANTE LEGAL

Código del Estudio:

Título: A plasma oxidative stress global index in patients with left ventricular hypertrophy

Yo (nombre y apellido).....en calidad de.....(relación con el participante) de.....(nombre y apellidos del participante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:.....

Comprendo que la participación del paciente es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

- En mi presencia se ha dado a.....(nombre del participante) toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar. Presto mi conformidad para que(nombre del participante) participe en este estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de los datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

SI NO

Firma del representante: Firma del investigador:

Nombre: Nombre:

Fecha: Fecha:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL SUJETO PARTICIPANTE

Código del Estudio:

Título: A plasma oxidative stress global index in patients with left ventricular hypertrophy

Yo (nombre y apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

.....

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

SI

NO

Firma del paciente:

Firma del investigador:

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO ORAL ANTE TESTIGOS

Código del Estudio:

Título: A plasma oxidative stress global index in patients with left ventricular hypertrophy

Yo.....(nombre y apellidos del testigo) declaro bajo mi responsabilidad que(nombre y apellidos del participante)

Ha leído (ó se le ha leído, en el caso en que el paciente no pueda leer), la hoja de información que se le ha entregado.

Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.

Ha recibido suficiente información sobre el estudio.

Ha hablado con:.....

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

- Ha expresado libremente su conformidad para participar en el estudio en este estudio y da para el acceso y utilización de los datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

SI

NO

Firma del testigo:

Firma del investigador:

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

9.3 Publicación asociada al proyecto de investigación

RESEARCH ARTICLE

Plasma protein thiolation index (PTI) as a potential biomarker for left ventricular hypertrophy in humans

Begoña Quintana-Villamandos^{1,2*}, Irene González del Pozo¹, Laia Pazó-Sayós¹, Jose María Bellón³, Álvaro Pedraz-Prieto⁴, Ángel G. Pinto⁴, Emilio Delgado-Baeza⁵

1 Departamento de Anestesiología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, **2** Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **3** Departamento de Estadística, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain, **4** Departamento de Cirugía Cardiovascular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, **5** Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

* Current address: Department of Anaesthesiology Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain
* begoquinti@gmail.com



Abstract

OPEN ACCESS

Citation: Quintana-Villamandos B, González del Pozo I, Pazó-Sayós L, Bellón JM, Pedraz-Prieto Á, Pinto AG, et al. (2019) Plasma protein thiolation index (PTI) as a potential biomarker for left ventricular hypertrophy in humans. PLoS ONE 14 (5): e0216359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216359>

Editor: Tatsuo Shimomura, International University of Health and Welfare, School of Medicine, JAPAN

Received: December 11, 2018

Accepted: April 18, 2019

Published: May 8, 2019

Copyright: © 2019 Quintana-Villamandos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by a grant from the Spanish Health Ministry (number FIS 16/02069) and Fondos Feder (to BQV).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Background

Left ventricular hypertrophy (LVH) has been associated with oxidative stress, although not with the protein thiolation index (PTI). This study explored the potential use of PTI as a biomarker of oxidative stress in patients with LVH.

Methods

We recruited 70 consecutive patients (n = 35 LVH and n = 35 non-LVH) based on an echocardiography study in our institution (left ventricular mass indexed to body surface area). Plasma levels of both S-thiolated protein and total thiols were measured as biomarkers of oxidative stress by spectrophotometry, and PTI was calculated as the molar ratio between S-thiolated proteins and the total thiol concentration.

Results

Values for plasma S-thiolated proteins were higher in patients with LVH than in the control group (P = 0.01). There were no differences in total thiols between the LVH group and the control group. Finally, PTI was higher in patients with LVH than in the control group (P = 0.001). The area under the ROC curve was 0.75 (95% CI, 0.63–0.86; P < 0.001), sensitivity was 70.6%, and specificity was 68.6%, thus suggesting that PTI could be used to screen for LVH. A multivariable logistic regression model showed a positive association (P = 0.02) between PTI and LVH (OR = 1.24 [95% CI, 1.03–1.49]) independently of gender (OR = 3.39 [95% CI, 0.60–18.91]), age (OR = 1.03 [95% CI, 0.96–1.10]), smoking (OR = 5.15 [95% CI, 0.51–51.44]), glucose (OR = 0.99 [95% CI, 0.97–1.01]), systolic arterial pressure (OR = 1.10 [CI 1.03–1.17]), diastolic arterial pressure (OR = 0.94 [CI 0.87–1.02]), dyslipidemia (OR = 1.46 [95% CI, 0.25–8.55]), estimated glomerular filtration rate (OR = 0.98 [95% CI,

0.96–1.01]), body mass index (OR = 1.03 [95% CI, 0.90–1.10]), and valvular and/or coronary disease (OR = 5.27 [95% CI, 1.02–27.21]).

Conclusions

The present study suggests that PTI could be a new biomarker of oxidative stress in patients with LVH.

Introduction

Left ventricular hypertrophy (LVH) is a mechanism by which the heart adapts to different types of stress [1]. LVH progresses over time, thus increasing the incidence of heart failure, malignant arrhythmias, myocardial ischemia, systolic dysfunction, sudden death, and cerebrovascular complications [2–5]. Certain pharmacological treatments produce regression of LVH and decrease the incidence of cardiovascular adverse events and mortality in affected patients [6–11]. Therefore, early diagnosis and initiation of appropriate treatment are essential.

Electrocardiography (ECG) and echocardiography are the most widely used procedures for the diagnosis of LVH, although ECG shows low sensitivity and echocardiography takes longer, is more expensive, and is not always available for technical reasons [12]. 21 studies show that the accuracy of electrocardiographic indexes in the diagnosis of LVH is unsatisfactory [13]. The ECG shows an area under the ROC curve of 0.55 with 14.7% sensitivity and 96.7% specificity [14] and the echocardiography shows an area under the ROC curve of 0.62 with 90% sensitivity and 25% specificity [15]. In clinical practice, echocardiography is the imaging technique of choice [16]. However, the cost-effectiveness of routine echocardiography for diagnosis of LVH has been debated [17].

Biomarkers of oxidative stress play a relevant role in diagnosis, evaluation of disease status, and assessment of the health-enhancing effects of therapies. The protein thiolation index (PTI) is a new biomarker of oxidative stress that is defined as the molar ratio of S-thiolated proteins to free protein thiols in plasma [18]. The PTI can be determined easily and inexpensively and could be used for routine for therapeutic monitoring in clinical practice [18]. LVH has been associated with oxidative stress [19], although not with PTI. The hypertrophic remodeling of the myocardium incorporates increased cardiomyocyte growth, reactive interstitial fibrosis and enhanced nitro-oxidative stress. Oxidative stress occurs when excess reactive oxygen species (ROS) are generated that cannot be adequately countered by intrinsic antioxidant systems. ROS are derived from many sources including mitochondria, xanthine oxidase, uncoupled nitric oxide synthases and NADPH oxidases. Growing evidence implicates redox-sensitive pathways in the development of LVH [20]. LVH shows intensified formation of ROS that include decreased NO (nitric oxide) production due to the oxidation of the endothelial NO synthase, reduced NO bioavailability and oxidation of the sGC enzyme (soluble guanylate cyclase) rendering it a hem-free and NO-insensitive form [21]. The protective role of the guanylate cyclase (GC)–cyclic guanosine monophosphate (cGMP)–protein kinase G (PKG) pathway in the cardiovascular system has been investigated [22]. The pharmacological activation of the sGC–cGMP pathway may exert reverse-remodeling properties in the myocardium and the intensified formation of ROS interferes with the above mentioned pathway [23].

This study explored the potential use of PTI as a biomarker of oxidative stress in patients with LVH.

Materials and methods

Study participants

We performed an observational study of 70 patients referred consecutively to our institution (to cardiac surgery section) in the period of time December 2015 to March 2016. When a patient is referred to cardiac surgery section, an echocardiography study is usually performed. The first patient, if the echocardiographic study showed LVH, this patient was included in the LVH group and if the echocardiographic study did not show LVH, the patient was included in the control group, and thus with the second patient referred to this section, and then with the third and so on, and then we have done the blood test to study PTI. In the period of time December 2015 to March 2016, 81 patients were referred to the cardiac surgery section, but we included 70 (11 patients show exclusion criteria). The clinical research ethics committee of the Hospital General Universitario Gregorio Marañón approved the study, and all participants gave their written informed consent to undergo the procedures. The inclusion criterion was age ≥ 18 years. The exclusion criteria were hemodialysis, rheumatoid arthritis, and alkaptouria. A clinical history was taken, an echocardiography study was performed, and values for S-thiolated protein and total thiols were determined. The echocardiography was performed using the iE33 system (Philips, CA, USA) equipped with a S5-1 probe (1–5 MHz). The echocardiographic diagnosis of LVH (based on left ventricular mass indexed to body surface area, LVMbs) was consistent with the recommendations of the American Society of Echocardiography [24] and was used to form the two study groups (LVH and non-LVH, 35 patients each).

Measurement of PTI in clinical samples

Blood collections and plasma preparation. Blood samples (2.4 mL) were drawn from the antecubital vein and collected in Vacutainer tubes (BD, Plymouth, UK) containing citrate (300 μ L) before being centrifuged at 900g for 10 minutes at 4°C to obtain plasma, which was aliquoted and stored at -80°C for further analysis.

Quantification of PTI. Plasma levels of both S-thiolated protein and total thiols were measured individually as biomarkers of oxidative stress by spectrophotometry in the same sample. Total thiols were assessed using the microplate 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) assay [25], and absorbance was measured at 412 nm in a Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader. Plasma S-thiolated proteins were determined by spectrophotometry using a new method with Ninhydrin reagent, as previously described [18]. PTI was calculated as the molar ratio of S-thiolated proteins to the concentration of free, DTNB-titratable SH group proteins (total thiols) [18].

Statistical methods

Categorical variables were expressed as frequency and percentage, and groups were compared using the Pearson chi-square test or Fisher's test as required. Normality was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Quantitative variables were described as mean \pm standard deviation (for continuous, normally distributed variables), and the between-group comparison was made with two-sample t-test and the Mann-Whitney U-test as appropriate. A receiver operating characteristic curve (ROC) was constructed to determine the diagnostic reliability of PTI. A cut-off point was chosen for the diagnosis of LVH, and their sensitivity, specificity, predictive values, and likelihood ratios were calculated with their respective confidence intervals. A univariate and multivariable logistic regression model was performed to study the strength of the association between PTI and LVH. The independent variables were gender, age, smoking, glucose, systolic and diastolic arterial pressure, estimated glomerular filtration rate (eGFR), body mass index (BMI), coronary disease and valve disease. P values < 0.05 were considered statistically significant. The

analysis was performed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0 (IBM Corp, Armonk, NY, USA) and Prism Graph Pad 6.0 (Graph Pad Software, California, USA).

Results

In total, 70 patients were included (35 diagnosed with LVH by echocardiography). The patients were considered to have systemic hypertension if they have a history of elevated blood pressure requiring long-term therapy, they were considered to have dyslipidemia if they had the diagnosis of dyslipidemia requiring long-term treatment and they were considered to have diabetes if they had the diagnosis of diabetes requiring long-term treatment. The clinical characteristics of patients are shown in [Table 1](#). No significant differences were observed between the groups for demographic and cardiovascular risk factors (gender, age, weight, body mass index, smoking, diabetes mellitus, hypertension, and dyslipidemia), organ disease (renal failure, coronary disease, valvular disease, coronary and valvular disease, and systolic dysfunction), or antihypertensive treatment (angiotensin receptor blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors, β -blockers, calcium channel blockers, and diuretics). As reported in [Table 1](#), there were significant differences in left ventricular mass index between the groups (LVH and no LVH, 141.8 ± 45.6 and 88.7 ± 25.1 g/m² respectively, $P < 0.001$).

The oxido-reductive status of the subjects under study is shown in [Fig 1](#). The new method for detecting plasma S-thiolated proteins showed an increase in LVH with respect to the control group (0.102 ± 0.035 vs. 0.07 ± 0.035 $\mu\text{mol/mg}$ protein, $P = 0.01$). There were no differences in total thiols between the LVH group and the control group (7.414 ± 2.250 and 7.819 ± 2.053 $\mu\text{mol/mg}$ protein, respectively). Finally, PTI was increased in patients with LVH with respect to the control group (0.014 ± 0.005 vs. 0.010 ± 0.004 , $P = 0.001$).

The coefficient of variation was 40.9% and the minimum detection limit was 0.001771.

The area under the ROC curve (0.75, 95% confidence interval [CI] 0.63–0.86; $P < 0.001$) shows the usefulness of the plasma PTI concentration in the diagnosis of LVH ([Fig 2](#)). At a cut-off value of 0.012, the 70.6% sensitivity and 68.6% specificity suggested that PTI could be used to screen for LVH. As this is an observational study, we show a positive predictive value of 68.6% and a negative predictive value of 70.6% for this cut-off ([Table 2](#)). We used the sensitivity and specificity of the cut-off to calculate the positive likelihood ratio (2.25) and negative likelihood ratio (0.43) ([Table 2](#)).

In order to study the association between PTI and LVH, we performed a multivariable logistic regression analysis adjusted for gender, age, smoking, diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia, renal failure, obesity, coronary disease, and valvular disease. As shown in [Table 3](#), a statistically significant positive association ($P = 0.02$) was observed between PTI and LVH, independently of the variables described in the model.

Discussion

PTI and LVH in humans

The main findings of our study were that patients with LVH had a higher PTI value than patients without LVH and that PTI level was independently associated with risk factors (gender, age, smoking, diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia, renal failure, obesity, coronary disease, and valvular disease). Therefore, this is the first study to propose PTI as a new biomarker of oxidative stress in patients with LVH.

Previous studies have revealed that LVH is one of the most important risk factors for cardiovascular disease (LVH is associated with a risk of cardiovascular events 2 to 4 times greater than in the healthy population) [8,26–28]. Therefore, diagnosis of LVH is important if we are to minimize the impact of cardiovascular disease. Methods for diagnosing LVH include ECG,

Table 1. Clinical characteristics of the study patients.

	LVH (n = 35)	No LVH (n = 35)	P	OR (95% CI)
Age (years)	69.7 (10.2)	63.5 (14.7)	0.06	1.04 (1–1.09)
Gender, M (%)	23 (65.7)	21 (60)	0.509	0.72 (0.27–1.92)
Weight (kg)	76.1 (13.8)	75.4 (14.9)	0.623	1.01 (0.98–1.04)
Body mass index (m ²)	1.8 (0.1)	1.8 (0.2)	0.824	0.43 (0.04–5.03)
LVMI (g/m ²)	141.8 (45.6)	88.7 (25.1)	<0.001	1.05 (1.02–1.07)
Proteins (g/dL)	6.9 (0.7)	6.9 (0.6)	0.841	0.92 (0.43–1.99)
Glucose (mg/dL)	115.3 (38)	109.8 (36.9)	0.667	1.00 (0.99–1.02)
Hemoglobin (g/dL)	12.9 (2.1)	13.4 (2)	0.333	0.89 (0.70–1.13)
Hematocrit (%)	38.6 (5.8)	39.8 (5.6)	0.375	0.96 (0.88–1.05)
Platelets x10 ³ /μL	211 (67)	196 (59)	0.304	1 (1–1.01)
ALT (U/L)	22.2 (19.9)	19.1 (10.6)	0.432	1.02 (0.99–1.04)
GGT (U/L)	28.5 (20.1)	29.7 (20.5)	0.805	1.00 (0.99–1.01)
Total bilirubin (mg/dL)	0.69 (0.5)	0.73 (0.5)	0.771	0.88 (0.36–2.13)
CK (U/L)	67.2 (56.4)	62.4 (38.4)	0.849	1.00 (0.99–1.01)
Smokers (%)	4 (11.4)	6 (17.1)	0.734	1.55 (0.4–6.07)
Diabetes mellitus (%)	11 (31.4)	7 (20)	0.243	0.52 (0.18–1.57)
Hypertension (%)	28 (80)	23 (65.7)	0.116	0.41 (0.13–1.27)
Dyslipidemia (%)	22 (62.8)	17 (48.6)	0.176	0.52 (0.20–1.35)
Renal failure (%)	9 (25.7)	10 (28.5)	0.611	1.11 (0.39–3.2)
Coronary disease (%)	1 (2.8)	3 (8.5)	0.310	4.20 (0.40–44.4)
Valvular disease (%)	22 (62.8)	15 (42.8)	0.155	0.17 (0.02–1.65)
Coronary and valvular (%)	12 (34.2)	17 (48.5)	0.264	1.73 (0.66–4.55)
Systolic Dysfunction (%)	13 (37.1)	14 (40)	0.881	1.08 (0.41–2.83)
Antihypertensive (%)				
ARB	7 (20)	3 (8.5)	0.188	0.36 (0.09–1.54)
ACEi	14 (40)	13 (37.1)	0.731	0.84 (0.32–2.22)
β-Blockers	12 (34.2)	11 (31.4)	0.733	0.84 (0.31–2.29)
Calcium channel blockers	11 (31.4)	6 (17.1)	0.143	0.43 (0.14–1.35)
Diuretics	15 (42.8)	10 (28.5)	0.179	0.51 (0.19–1.38)

LVH, left ventricular hypertrophy; LVMI, left ventricular mass index. ALT, alanine transaminase. GGT, gamma-glutamyl transpeptidase. CK, creatine kinase. ARB, angiotensin receptor blockers; ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitors.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216359.t001>

echocardiography, and cardiac magnetic resonance [29]. ECG is an accessible and inexpensive method for the diagnosis of LVH, however the sensitivity of ECG ranges from 7% to 35% for mild LVH to 30% to 60% for moderate to severe LVH [30]. Although not immune from technical limitations, echocardiography is more sensitive than ECG in diagnosing LVH and has been regarded as a diagnostic gold standard [24]. Cardiac magnetic resonance is considered more accurate for estimated left ventricular mass compared to echocardiography, however it is less commonly used because it has higher cost and is less feasible and available [31]. Thus, the low sensitivity, lengthy diagnostic, poor cost-effectiveness ratio, and technical complexity highlight the need for new methods to diagnose LVH. As an alternative, biomarkers could play a relevant role in diagnosis of LVH. Biomarkers are an indicator of pathogenic processes. They indicate the presence/absence of disease and can be used to monitor disease development and progression and response to treatment [32]. Several studies have evaluated natriuretic peptides for the diagnosis of LVH, but the results are contradictory [33–37]. This might be due to the heterogeneity of the populations included, the type of natriuretic peptide analyzed, and the

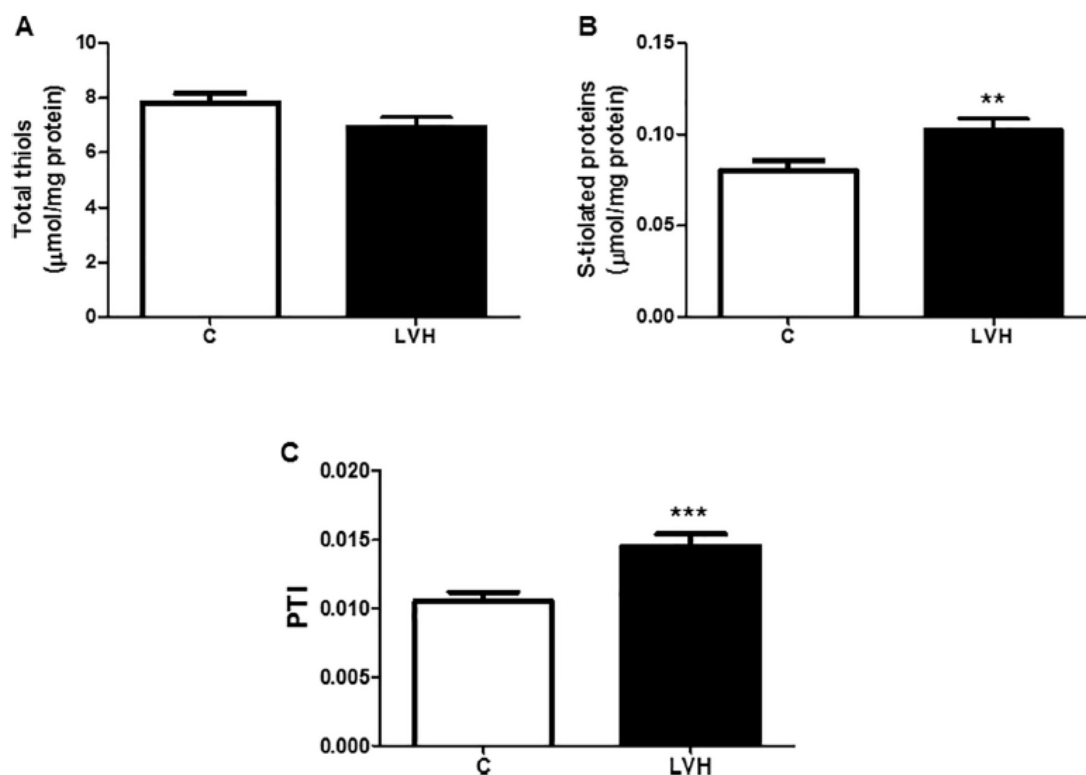


Fig 1. Protein thiolation index in patients with left ventricular hypertrophy. Association plasma total thiols (A), S-thiolated proteins (B), and Protein thiolation index (PTI) (C) to the presence of left ventricular hypertrophy; data are expressed as the mean \pm SD; statistically significant differences between control group (C) and left ventricular hypertrophy group (LVH) are shown (** $P < 0.001$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216359.g001>

method used to confirm LVH. Analysis of the usefulness of plasma NT-proBNP (N-terminal pro-brain natriuretic peptide) concentrations in the diagnosis of LVH shows an area under the ROC curve of 0.75 with 76.6% sensitivity and 65.7% specificity [33]. However, only patients who presented hypertension without systolic dysfunction were included. A direct correlation was found between cardiotrophin-1 and left ventricular mass index, with an area under the ROC curve of 0.78, with 70% sensitivity and 75% specificity for predicting LVH [38]. Serum miR-27b which was significantly elevated in hypertensive patients with LVH from hypertensive patients without LVH, could be used to screen for LVH (AUC of 0.81 with 79.1% sensitivity and 70.3% specificity) [29]. Oxidative stress has an important pathophysiological role in patients with LVH [19]. Clinical studies have determined correlations between biomarkers of oxidative stress and LVH: Galectin-3 has increased in patients with LVH related to hypertension [39] and serum oxidized low-density lipoprotein shows correlation with LVH related to chronic kidney disease [40]. However, these biomarkers are not commonly used in the LVH diagnosis, thus the role of oxidative stress in patients with LVH is underestimated in clinical practice. Consequently, biomarkers with inexpensive reagents that can be implemented easily and quickly and are easily measurable (plasma biomarkers) are needed to facilitate routine measurements of oxidative stress in patients with LVH. Unfortunately, it is difficult to find

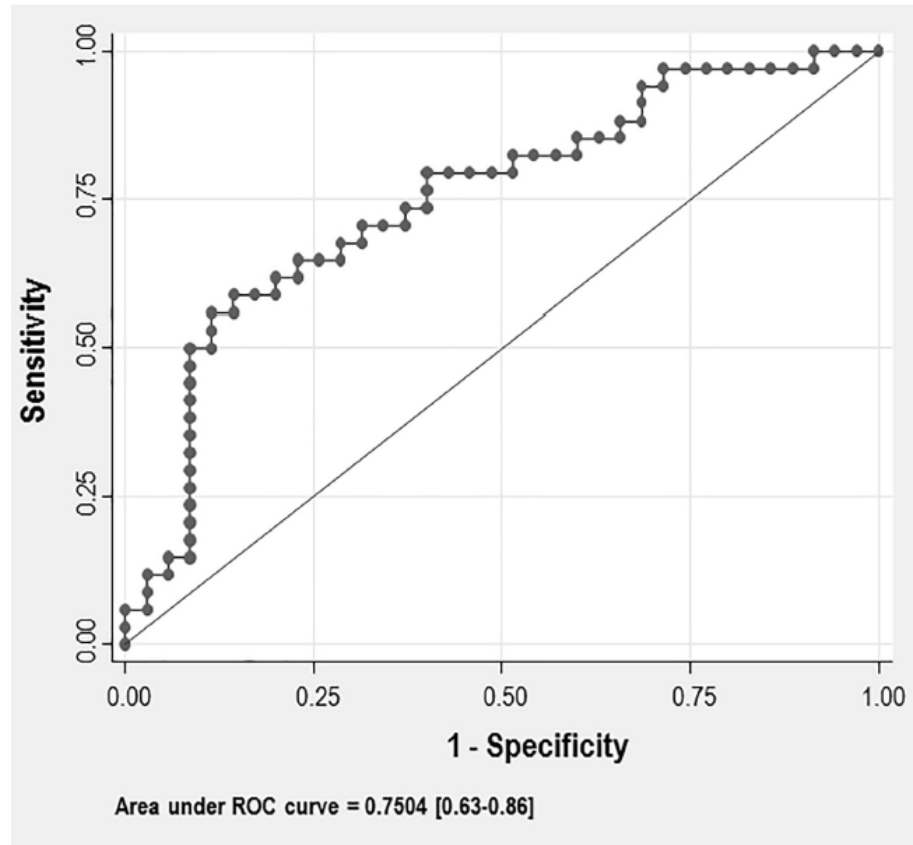


Fig 2. Receiver operating characteristic curve. Receiver operator curve (ROC) analysis for protein thiolation index (PTI) to diagnose left ventricular hypertrophy.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216359.g002>

biomarkers with such characteristics [41–42]. PTI is a new biomarker of oxidative stress [18,43]. However, no association has been established with LVH. In the present study, we used a new spectrophotometry method, which has been validated by other authors, to analyze PTI [18]. The technique is easy to perform and suitable for clinical analyses with a high daily throughput, thus enabling rapid assessment.

Table 2. Indexes of diagnostic validity of protein thiolation index for left ventricular hypertrophy.

PTI Cut-off	Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)	PPV % (95% CI)	NPV % (95% CI)	LR+ (95% CI)	LR- (95% CI)
0.012	70.6 (52.5–84.9)	68.6 (50.7–83.1)	68.6 (50.7–83.1)	70.6 (52.5–84.9)	2.25 (1.32–3.84)	0.43 (0.24–0.76)

PTI, protein thiolation index; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; LR+, positive likelihood ratio; LR-, negative likelihood ratio.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216359.t002>

Table 3. Multivariable logistic regression model: association protein thiolation index and left ventricular hypertrophy.

	OR (95% CI)	P
PTI	1.243 (1.031–1.497)	0.022
Gender	3.394 (0.609–18.917)	0.163
Age	1.032 (0.962–1.108)	0.379
Smokers	5.156 (0.517–51.443)	0.162
Glucose	0.994 (0.971–1.017)	0.614
Systolic arterial pressure	1.102 (1.030–1.179)	0.005
Diastolic arterial pressure	0.944 (0.872–1.022)	0.157
Dyslipidemia	1.467 (0.252–8.557)	0.670
Estimated glomerular filtration rate	0.988 (0.961–1.016)	0.410
Body mass index	1.038 (0.909–1.186)	0.580
Valvular and/or coronary disease	5.276 (1.023–27.211)	0.047

PTI (x1000), protein thiolation index

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216359.t003>

Oxidative stress is a complex problem that is the consequence of an imbalance between oxidative damage and antioxidant defense, where many biomarkers play a role [44]. In addition, the complex and multifactorial nature of oxidative stress makes it difficult to assign a prevalent role to a particular biomarker in a disease and does not provide information on overall oxidative status (oxidant and antioxidant) [45]. However, given that PTI is defined as the molar ratio of S-thiolated proteins (oxidant agents) to free protein thiols in plasma (antioxidant molecules) [18], it includes biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense.

Strengths and limitations

Our study is subject to a series of limitations. First, we examined the association between determination of plasma PTI and LVH in order to monitor the development of LVH. We intend to use this approach to check the efficiency of treatment in patients with heart disease (coronary and/or valvular). Therefore, it would be interesting to reproduce the results obtained in this study in patients with hypertension only (since this is the most frequent cause of LVH) in order to be able to use PTI for screening of LVH in the general population. Second, we evaluated LVH using echocardiography. The interobserver variability of this technique could lead to bias [46] thus, echocardiography should be performed by single cardiologist, however echocardiography was performed by a small group of experienced cardiologists. Finally, the premise of our investigation is that screening with PTI could be less expensive than standard echocardiography; however, the high quality of echocardiography may reduce the cost gap between both approaches [47].

Conclusion

Our findings suggest that PTI could be a new biomarker of oxidative stress in patients with LVH. It remains necessary to validate the clinical utility of PTI using a large, blinded set of samples and to establish comparability and standards for quality control in order to monitor the development of LVH and to check the efficiency of treatment in the general population.

Author Contributions

Conceptualization: Begoña Quintana-Villamandos, Ángel G. Pinto, Emilio Delgado-Baeza.

Data curation: Begoña Quintana-Villamandos, Irene González del Pozo, Laia Pazó-Sayós, Álvaro Pedraz-Prieto.

Formal analysis: Begoña Quintana-Villamandos, Jose María Bellón, Ángel G. Pinto, Emilio Delgado-Baeza.

Funding acquisition: Begoña Quintana-Villamandos.

Investigation: Begoña Quintana-Villamandos, Irene González del Pozo, Laia Pazó-Sayós, Jose María Bellón, Álvaro Pedraz-Prieto, Ángel G. Pinto, Emilio Delgado-Baeza.

Methodology: Begoña Quintana-Villamandos, Irene González del Pozo, Laia Pazó-Sayós, Jose María Bellón, Álvaro Pedraz-Prieto, Ángel G. Pinto, Emilio Delgado-Baeza.

Project administration: Begoña Quintana-Villamandos.

Resources: Begoña Quintana-Villamandos.

Software: Irene González del Pozo, Laia Pazó-Sayós, Jose María Bellón, Álvaro Pedraz-Prieto.

Supervision: Begoña Quintana-Villamandos, Ángel G. Pinto, Emilio Delgado-Baeza.

Validation: Begoña Quintana-Villamandos, Irene González del Pozo, Laia Pazó-Sayós, Jose María Bellón, Álvaro Pedraz-Prieto, Ángel G. Pinto, Emilio Delgado-Baeza.

Visualization: Irene González del Pozo, Laia Pazó-Sayós, Jose María Bellón, Álvaro Pedraz-Prieto.

Writing – original draft: Begoña Quintana-Villamandos.

Writing – review & editing: Begoña Quintana-Villamandos, Irene González del Pozo, Laia Pazó-Sayós, Jose María Bellón, Álvaro Pedraz-Prieto, Ángel G. Pinto, Emilio Delgado-Baeza.

References

1. Lazzeroni D, Rimoldi O, Camici PG. From left ventricular hypertrophy to dysfunction and failure. *Circ J* 2016; 80:555–564. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-16-0062> PMID: 26853555
2. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990; 322:1561–1566. <https://doi.org/10.1056/NEJM199005313222203> PMID: 2139921
3. Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med* 1991; 114:345–352. PMID: 1825164
4. Verdecchia P, Porcellati C, Reboldi G, Gattobigio R, Borgioni C, Pearson TA, et al. Left ventricular hypertrophy as an independent predictor of acute cerebrovascular events in essential hypertension. *Circulation* 2001; 104:2039–2044. PMID: 11673343
5. Bang CN, Soliman EZ, Simpson LM, Davis BR, Devereux RB, Okin PM. Electrocardiographic Left Ventricular Hypertrophy Predicts Cardiovascular Morbidity and Mortality in Hypertensive Patients: The ALL-HAT Study. *Am J Hypertens* 2017; 30:914–922. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpx067> PMID: 28430947
6. Mathew J, Sleight P, Lonn E, Johnstone D, Pogue J, Yi Q, et al. Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor Ramipril. *Circulation* 2001; 104:1615–1621. PMID: 11581138
7. Bang CN, Devereux RB, Okin PM. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy or strain is associated with lower incidence of cardiovascular morbidity and mortality in hypertensive patients independent of blood pressure reduction—ALIFE review. *J Electrocardiol* 2014; 47:630–635. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2014.07.003> PMID: 25052475
8. Okin PM, Devereux RB, Jern S, Kjeldsen SE, Julius S, Nieminen MS, et al. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during antihypertensive treatment and the prediction of major cardiovascular events. *JAMA* 2004; 292:2343–2349. <https://doi.org/10.1001/jama.292.19.2343> PMID: 15547161

9. Devereux RB, Wachtell K, Gerdts E, Boman K, Nieminen MS, Papademetriou V, et al. Prognostic significance of left ventricular mass during treatment of hypertension. *JAMA* 2004; 292:2350–2356. <https://doi.org/10.1001/jama.292.19.2350> PMID: 15547162
10. Pierdomenico SD, Cuccurullo F. Risk reduction after regression of echocardiographic left ventricular hypertrophy in hypertension: a meta-analysis. *Am J Hypertens* 2010; 23:876–881. <https://doi.org/10.1038/ajh.2010.80> PMID: 20414193
11. Verdecchia P, Angeli F, Borgioni C, Gattobigio R, de Simone G, Devereux RB, et al. Changes in cardiovascular risk by reduction of left ventricular mass in hypertension: a meta-analysis. *Am J Hypertens* 2003; 16(11 Pt 1):895–899. PMID: 14573325
12. Cabezas M, Comellas A, Gómez JR, López Grillo L, Casal H, Carrillo N, et al. R. Comparación de la sensibilidad y especificidad de los criterios electrocardiográficos para la hipertrofia ventricular izquierda según métodos de Romhilt-Estes, Sokolow-Lyon, Cornell y Rodríguez Padial. *Rev Esp Cardiol* 1997; 50:31–35.
13. Pewsner D, Jüni P, Egger M, Battaglia M, Sundström J, Bachmann LM. Accuracy of electrocardiography in diagnosis of left ventricular hypertrophy in arterial hypertension: systematic review. *BMJ* 2007; 335:711. <https://doi.org/10.1136/bmj.39276.636354.AE> PMID: 17726091
14. Rider OJ, Ntusi N, Bull SC, Nethononda R, Ferreira V, Holloway CJ, et al. Improvements in ECG accuracy for diagnosis of left ventricular hypertrophy in obesity. *Heart* 2016; 102:1566–1572. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-309201> PMID: 27486142
15. Supe-Markovina K, Nielsen JC, Musani M, Panesar LE, Woroniecki RP. Assessment of Left Ventricular Mass and Hypertrophy by Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Pediatric Hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2016; 18:976–981.
16. Hlatky MA, Greenland P, Arnett DK, Ballantyne CM, Criqui MH, Elkind MS, et al. Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2009; 119:2408–2416. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192278> PMID: 19364974
17. Cuspidi C, Meani CS, Valerio C, Fusi V, Sala C, Zanchetti A. Left ventricular hypertrophy and cardiovascular risk stratification: impact and cost-effectiveness of echocardiography in recently diagnosed essential hypertension. *J Hypertens* 2006; 24:1671–1676. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000239305.01496.ca> PMID: 16877972
18. Giustarini D, Dalle-Donne I, Lorenzini S, Selvi E, Colombo G, Milzani A, et al. Protein thiolation index (PTI) as a biomarker of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2012; 53:907–915. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.022> PMID: 22732185
19. Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension* 2007; 49:241–248. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000254415.31362.a7> PMID: 17190878
20. Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 2007; 93:903–907. <https://doi.org/10.1136/hrt.2005.068270> PMID: 16670100
21. Stasch JP, Pacher P, Evgenov OV. Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. *Circulation* 2011; 123:2263–2273 <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.981738> PMID: 21606405
22. Kraehling JR, Sessa WC. Contemporary approaches to modulating the nitric oxide-cGMP pathway in cardiovascular disease. *Circ Res* 2017; 120:1174–1182. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.303776> PMID: 28360348
23. Ruppert M, Korkmaz-Icöz S, Li S, Brlecic P, Németh BT, Oláh A, et al. Comparison of the reverse-remodeling effect of pharmacological soluble guanylate cyclase activation with pressure unloading in pathological myocardial left ventricular hypertrophy. *Front Physiol* 2019; 9:1869. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01869> PMID: 30670980
24. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2015; 28:1–39. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2014.10.003> PMID: 25559473
25. Hawkins CL, Morgan PE, Davies MJ. Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic Biol Med* 2009; 46:965–988. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.007> PMID: 19439229
26. Wachtell K, Okin PM, Olsen MH, Dahlöf B, Devereux RB, Ibsen H, et al. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during antihypertensive therapy and reduction in sudden cardiac death: the LIFE Study. *Circulation* 2007; 116:700–705. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.666594> PMID: 17664372
27. Kannel WB. Prevalence and natural history of electrocardiographic left ventricular hypertrophy. *Am J Med* 1983; 75: 4–11.

28. Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J* 2001; 141:334–341. <https://doi.org/10.1067/mhj.2001.113218> PMID: 11231428
29. Wang Y, Chen S, Gao Y, Zhang S. Serum MicroRNA-27b as a Screening Biomarker for Left Ventricular Hypertrophy. *Tex Heart Inst J* 2017; 44:385–389. <https://doi.org/10.14503/THIJ-16-5955> PMID: 29276436
30. Nadour W, Biederman RW. Is left ventricular hypertrophy regression important? Does the tool used to detect it matter? *The Journal of Clinical Hypertension*. 2009; 11:441–447. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7176.2009.00137.x> PMID: 19695032
31. Hendel RC, Patel MR, Kramer CM, Poon M, Hendel RC, Carr JC, et al. ACCF/ACR/SCCT/SCMR/ASNC/NASCI/SCAI/SIR 2006 appropriateness criteria for cardiac computed tomography and cardiac magnetic resonance imaging: a report of the American College of Cardiology Foundation Quality Strategic Directions Committee Appropriateness Criteria Working Group, American College of Radiology, Society of Cardiovascular Computed Tomography, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance, American Society of Nuclear Cardiology, North American Society for Cardiac Imaging, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Interventional Radiology. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48:1475–97. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.07.003> PMID: 17010819
32. Boenzi S, Diodato D. Biomarkers for mitochondrial energy metabolism diseases. *Essays Biochem* 2018; 62:443–454. <https://doi.org/10.1042/EBC20170111> PMID: 29980631
33. Andrade H, Morillas P, Castillo J, Roldán J, Mateo I, Agudo P, et al. Validez diagnóstica del NT-proBNP frente al electrocardiograma en la detección de hipertrofia ventricular izquierda de origen hipertensivo. *Rev Esp Cardiol* 2011; 64: 939–941. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.02.019> PMID: 21664755
34. de Lemos JA, McGuire DK, Khera A, Das SR, Murphy SA, Omland T, et al. Screening the population for left ventricular hypertrophy and left ventricular systolic dysfunction using natriuretic peptides: results from the Dallas Heart Study. *Am Heart J* 2009; 157:746–753. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2008.12.017> PMID: 19332205
35. Nakamura M, Tanaka F, Yonezawa S, Satou K, Nagano M, Hiramori K. The limited value of plasma B-type natriuretic peptide for screening for left ventricular hypertrophy among hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2003; 16:1025–1029. PMID: 14643576
36. Mueller T, Gegenhuber A, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. Capability of B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP as indicators of cardiac structural disease in asymptomatic patients with systemic arterial hypertension. *Clin Chem* 2005; 51:2245–2251. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.056648> PMID: 16223888
37. Goetze JP, Mogelvang R, Maage L, Scharling H, Schnohr P, Sogaard P, et al. Plasma pro-B-type natriuretic peptide in the general population: screening for left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction. *Eur Heart J* 2006; 27:3004–3010. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehl406> PMID: 17118955
38. López B, González A, Lasarte JJ, Sarobe P, Borrás F, Díaz A, et al. Is plasma cardiotrophin-1 a marker of hypertensive heart disease? *J Hypertens* 2005; 23:625–632. PMID: 15716706
39. Nar G, Aksan G, Gorgulu O, Inci S, Soylu K, Ozdemir M, et al. Galectin-3 as a novel biomarker for the diagnosis of essential hypertension with left ventricular hypertrophy. *J Exp Clin Med* 2016; 33:123–128.
40. Drożdż D, Kwinta P, Sztelfko K, Kordon Z, Drożdż T, Łątka M, et al. Oxidative Stress Biomarkers and Left Ventricular Hypertrophy in Children with Chronic Kidney Disease. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016:7520231. <https://doi.org/10.1155/2016/7520231> PMID: 26885251
41. Xanthakis V, Larson MG, Wollert KC, Aragam J, Cheng S, Ho J, et al. Association of novel biomarkers of cardiovascular stress with left ventricular hypertrophy and dysfunction: implications for screening. *J Am Heart Assoc* 2013; 2:e000399. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000399> PMID: 24200688
42. Coutinho T, Al-Omari M, Mosley TH Jr, I.J. Kullo IJ. Biomarkers of left ventricular hypertrophy and remodeling in blacks. *Hypertension* 2011; 58:920–925. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.178095> PMID: 21986506
43. Colombo G, Reggiani F, Podestà MA, Garavaglia ML, Portinaro NM, Milzani A, et al. Plasma protein thiolation index (PTI) as a biomarker of thiol-specific oxidative stress in haemodialyzed patients. *Free Radic Biol Med* 2015; 89:443–451. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.022> PMID: 26453922
44. González J, Valls N, Brito R, Rodrigo R. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World J Cardiol* 2014; 6:353–366. <https://doi.org/10.4330/wjc.v6.i6.353> PMID: 24976907
45. Veglia F, Cavala V, Tremolli E. OXY-SCORE: a global index to improve evaluation of oxidative stress by combining pro- and antioxidant markers. *Methods Mol Biol* 2010; 594:197–213. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_14 PMID: 20072919
46. Morbach C, Gelbrich G, Breunig M, Tiffe T, Wagner M, Heuschmann PU, et al. Impact of acquisition and interpretation on total inter-observer variability in echocardiography: results from the quality assurance program of the STAAB cohort study. *Int J Cardiovasc Imaging* 2018; 24:1057–1065.

47. Galasko GI, Barnes SC, Collinson P, Lahiri A, Senior R. What is the most cost-effective strategy to screen for left ventricular systolic dysfunction: natriuretic peptides, the electrocardiogram, hand-held echocardiography, traditional echocardiography, or their combination? *Eur Heart J* 2006; 27:193–200. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi559> PMID: 16267076