

Persistencia del estrés oxidativo postrasplante cardíaco: estudio comparativo entre pacientes con trasplante cardíaco y con insuficiencia cardíaca crónica estable

Oswaldo Pérez, Pablo Castro, Guillermo Díaz-Araya^a, Danniels Nettle^b, Francisco Moraga^a, Mario Chiong^b, Jorge Jalil, Ricardo Zalaquett, Sergio Morán, Pedro Becker, Ramón Corbalán y Sergio Lavandero^b

Departamento de Enfermedades Cardiovasculares. Hospital Clínico. Pontificia Universidad Católica de Chile.
Departamentos de ^aQuímica Farmacológica y Toxicológica y de ^bBioquímica y Biología Molecular.
Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago. Chile.

Introducción y objetivo. Existe estrés oxidativo en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (ICC). El trasplante cardíaco, alternativa terapéutica importante en estos pacientes, podría disminuir el estrés oxidativo al mejorar la función cardíaca. Nuestro objetivo fue evaluar el estrés oxidativo postrasplante cardíaco.

Pacientes y método. Fueron estudiados 3 grupos experimentales: a) trasplantados cardíacos, sin evidencia de rechazo (n = 11); b) pacientes con ICC capacidad funcional III de la NYHA (n = 19), y c) sujetos controles sanos (n = 14). El estrés oxidativo se evaluó determinando valores plasmáticos de malondialdehído (MDA), y actividades de glutatión peroxidasa (GSH-Px), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD).

Resultados. Las características demográficas fueron similares entre los grupos. El tiempo postrasplante fue 20,0 ± 4,8 meses. Los valores de MDA en trasplantados y con ICC fueron significativamente mayores que en sujetos normales (3,35 ± 0,8; 3,27 ± 1,7, y 0,90 ± 0,3 M, respectivamente). La actividad de GSH-Px aumentó en trasplantados respecto al grupo control (0,40 ± 0,07 y 0,33 ± 0,05 U/g Hb, respectivamente). La actividad de SOD fue menor en trasplantados respecto al grupo control ICC (0,44 ± 0,1 frente a 0,87 ± 0,6 U/mg Hb). No hubo diferencias en las actividades de CAT entre trasplantados y pacientes con ICC.

Conclusión. Los pacientes sometidos a trasplante cardíaco tienen un aumento del estrés oxidativo, evidenciado por una elevación del MDA y por una disminución de la actividad de SOD, a pesar de una mayor actividad de GSH-Px. Este aumento del estrés oxidativo fue similar al encontrado en pacientes con ICC estable CF III de la NYHA, y se observó en ausencia de episodios reconocidos de infección o rechazo.

Palabras clave: Estrés. Trasplante. Insuficiencia cardíaca.

Financiado por FONDECYT 1010992.

Correspondencia: Dr. P. Castro.
Departamento de Enfermedades Cardiovasculares.
Hospital Clínico. Pontificia Universidad Católica.
Marcoleta, 347. Santiago. Chile.
Correo electrónico: pcastro@med.puc.cl

Recibido el 27 de julio de 2001.
Aceptado para su publicación el 1 de abril de 2002.

Persistence of Oxidative Stress After Heart Transplantation: a Comparative Study of Patients with Heart Transplant Versus Chronic Stable Heart Failure

Introduction and objective. Chronic heart failure (CHF) is associated with oxidative stress. Heart transplantation, an important therapeutic alternative in these patients, could reduce oxidative stress by improving cardiac function. Our aim was to evaluate post-heart transplantation oxidative stress.

Patients and method. We studied three experimental groups: a) heart transplant recipients without evidence of rejection (n = 11); b) NYHA class III CHF patients (n = 19), and c) healthy control subjects (n = 14). Oxidative stress was assessed by measuring plasma malondialdehyde levels (MDA), and determining the enzymatic activities of glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD).

Results. The demographic characteristics of the three groups were similar. Mean time from transplantation was 20.0 ± 4.8 months. Mean MDA plasma levels in heart transplantation and CHF patients were significantly higher than in normal subjects (3.35 ± 0.8; 3.27 ± 1.7 y 0.9 ± 0.3 M, respectively). GSH-Px activity increased after transplantation compared to control subjects (0.40 ± 0.06 and 0.33 ± 0.05 U/g Hb, respectively), but not the CHF group. A significant decrease in SOD activity was found in the heart transplant vs. CHF group (0.44 ± 0.1 vs. 0.87 ± 0.6 U/mg Hb). There were no differences in CAT values between heart transplant and CHF patients.

Conclusion. These findings demonstrated the presence of permanent oxidative stress in patients who have undergone heart transplantation, characterized by an increase in MDA and a decrease in SOD activity, despite an increase in GSH-Px activity.

Key words: Stress. Transplantation. Heart failure.

Full English text available at: www.revespcardiol.org

ABREVIATURAS

ICC: insuficiencia cardíaca crónica.
MDA: malondialdehído.
GSH-Px: glutatión peroxidasa.
CAT: catalasa.
SOD: superóxido dismutasa.

INTRODUCCIÓN

Aunque han existido importantes avances en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica (ICC), su morbimortalidad continúa siendo elevada¹. Diversos estudios han demostrado un aumento del estrés oxidativo en pacientes con ICC. La isquemia-reperusión, mayor actividad neurohumoral, estimulación por citoquinas y la presencia de células inflamatorias son estímulos generadores de radicales libres y modificadores del estado de estrés oxidativo en la ICC²⁻⁵. Estudios básicos y clínicos sugieren que los radicales libres del oxígeno podrían contribuir al deterioro de la función cardíaca²⁻⁷. Los radicales libres incluyen los aniones superóxido, radicales hidroxilo, peróxido y H₂O₂⁸. Estos son productos del metabolismo y se mantienen en bajas concentraciones mediante la acción de diversos sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En condiciones normales existe un balance entre la producción de los radicales libres del oxígeno y los sistemas defensivos antioxidantes. Cualquier alteración en este balance a favor de los radicales libres produce estrés oxidativo.

Experimentos en ratas con infarto agudo de miocardio han sugerido una estrecha relación entre la aparición de insuficiencia cardíaca y estrés oxidativo³. Estudios *in vitro* han revelado que breves exposiciones a radicales libres resultan en disminución de fosfatos de alta energía, pérdida de función contráctil y anomalías estructurales⁹. Se han demostrado concentraciones elevadas de pentano en el aire espirado y un aumento en los valores plasmáticos de malondialdehído (MDA), un marcador indirecto de peroxidación lipídica, en pacientes con ICC¹⁰⁻¹². Además, altas concentraciones de MDA en el plasma se correlacionan con una mayor gravedad de los síntomas y compromiso funcional de la ICC¹³.

Se han utilizado diferentes intervenciones terapéuticas para disminuir el estrés oxidativo en pacientes con ICC. A nivel experimental, utilizando modelos de isquemia y reperusión, se ha demostrado que la administración de antioxidantes previene o retrasa la transición desde un estado de insuficiencia cardíaca compensada hacia uno de descompensación¹⁴. A nivel clínico, la terapia crónica con bloqueadores beta en pacientes con ICC disminuye el estrés oxidativo¹⁵. El trasplante cardíaco es una alternativa terapéutica con-

solidada en pacientes con ICC y grave limitación funcional¹⁶. Teóricamente, el trasplante cardíaco podría disminuir el estrés oxidativo al mejorar la función cardíaca. Sin embargo, estudios realizados en animales han demostrado un mayor metabolismo de radicales libres del oxígeno con un consiguiente aumento del estrés oxidativo¹⁷⁻¹⁹. Pocos estudios clínicos han evaluado el estado del estrés oxidativo postrasplante cardíaco, y algunos autores lo han relacionado con la presencia de infección, rechazo o uso de fármacos inmunosupresores²⁰⁻²². Recientemente, un aumento del estrés oxidativo se ha atribuido a una disminución de la capacidad enzimática antioxidante después del primer año del trasplante²³.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el estado de estrés oxidativo postrasplante cardíaco utilizando mediciones plasmáticas de MDA y de la actividad de los diferentes sistemas antioxidantes enzimáticos. Las mediciones obtenidas se comparan con la realizada en pacientes con ICC y con las de un grupo de sujetos sanos.

PACIENTES Y MÉTODO

Pacientes con trasplante cardíaco

En este estudio se incluyó a 11 pacientes con trasplante cardíaco (8 varones), con una edad promedio de 48 años (rango, 16-62 años). El tiempo promedio postrasplante fue de 20 meses (rango, 12-26 meses). El protocolo de inmunosupresión consistió en ciclosporina A, azatioprina y esteroides. En todos los pacientes se realizaron biopsias endomiocárdicas dentro de 2 semanas de la medición de los parámetros de estrés oxidativo. Las biopsias se efectuaron por punción yugular según la técnica clásica y biótomos desechables, en las cuales se obtiene al menos 4 muestras para diagnóstico microscópico. Las biopsias se analizaron siguiendo la clasificación del Grupo de Estudio del Rechazo Cardíaco de la Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón y Pulmón²⁴. Ningún paciente tenía evidencia de rechazo cardíaco en las biopsias efectuadas ni evidencias de infección en un período de 3 meses como mínimo. El ecocardiograma de todos los pacientes mostraba una fracción de eyección normal y se encontraban en capacidad funcional (CF) I de la NYHA.

Pacientes con insuficiencia cardíaca

Se estudió a 19 pacientes con insuficiencia cardíaca, todos varones, con una edad promedio de 61 años (rango, 44-75), en CF III, estables y en tratamiento habitual (diuréticos, digital, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina [IECA] y sin bloqueadores beta al momento del estudio). Todos los pacientes tenían dilatación y disfunción sistólica con fracción de eyección (FE) determinada por ecocardiograma < 40%. La etiología fue isquémica en 7 pacientes (37%), miocardio-

patía dilatada idiopática en siete (37%) e hipertensiva en 5 pacientes (26%). Se excluyó a pacientes con: *a*) CF IV, shock cardiogénico; *b*) cirugía de *bypass* coronario, angioplastia o infarto de miocardio en los últimos 3 meses; *c*) angina crónica; *d*) cambio en el tratamiento o uso de bloqueadores beta en los últimos 2 meses; *e*) enfermedad valvular significativa; *f*) presencia de factores descompensantes como síndrome coronario agudo, disfunción valvular, arritmia, infección, anemia grave, hipertiroidismo o embolia pulmonar, y *g*) presencia de condiciones que pudieran afectar las determinaciones de estrés oxidativo como insuficiencia renal (creatinina plasmática > 2 mg/dl), enfermedades autoinmunes, neoplasia, enfermedad pulmonar o hepática avanzada, inflamación aguda o crónica.

Controles sanos

Por motivos éticos no se pudo contar con un grupo control que recibiera tratamiento con fármacos inmunosupresores. El grupo control estuvo conformado por 14 sujetos sanos pareados por edad y sexo. Todos ellos eran asintomáticos, sin antecedentes mórbidos de importancia y examen físico normal. Se excluyó a sujetos con factores de riesgo coronario conocidos, o si estaban en tratamiento con cualquier medicación, suplementos vitamínicos, antioxidantes, o ingerían alcohol de forma regular.

Todos los sujetos firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Marcadores de estrés oxidativo

Los parámetros de estrés oxidativo se determinaron en sangre periférica. En los 3 grupos se midieron las actividades enzimáticas de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y los valores plasmáticos del MDA, para lo cual se obtuvo 20 ml de sangre por punción venosa periférica. La muestra se centrifugó a 3.000 rpm por 10 min a temperatura de 4 °C. El plasma se separó y almacenó a -20 °C. Los eritrocitos se lavaron 3 veces con solución salina y fueron posteriormente lisados y almacenados a -20 °C.

MDA

Se determinó en el plasma midiendo el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)²⁵. Sus valores se expresaron como M.

SOD

Se extrajo el hemolizado utilizando el método descrito por Mc Cord et al²⁶. Para la medición de actividad se usó el método de Misra et al²⁷. Éste se basa en la determinación de la velocidad de autooxidación de

epinefrina, la que es acelerada por SOD. El grado de oxidación se determinó por fotolorimetría a 480 nm. La actividad se expresó como unidades (U) por mg hemoglobina (Hb).

CAT

Se determinó por el método descrito por Beers et al²⁸. La reacción se inició por adición de 1 ml de 30 mM H₂O₂. El cambio en absorbancia a 240 nm se midió por 1 min a 25 °C. En una parte de la muestra remanente se determinó la hemoglobina y la actividad se expresó como U (nm de H₂O₂/min) por g Hb.

GSH-Px

Se determinó con el método descrito por Paglia et al²⁹ y se expresó como U (nm NADPH oxidado/min) por g Hb.

Análisis estadístico

Se utilizó el test de la t de Student para muestras no pareadas, y se consideró como significativo un valor de $p < 0,05$. Los valores se presentan como la media \pm desviación estándar (DE).

RESULTADOS

La tabla 1 muestra las características clínicas de los pacientes trasplantados y de los pacientes con insufi-

TABLA 1. Características de la población estudiada

Características	Trasplantados	IC	p
Generales			
Número	11	19	
Edad	48 \pm 20	61 \pm 10	NS
Sexo (V/M)	8/3	19/0	
Factores de riesgo n (%)			
HTA	2 (18)	5 (26)	
Diabetes mellitus	-	3 (16)	
Dislipidemia	2 (18)	4 (21)	
IAM	-	6 (32)	< 0,05
Tabaquismo	-	-	
Medicamentos n (%)			
IECA	3 (27)	13 (68)	< 0,05
Diuréticos	2 (18)	16 (84)	< 0,05
Digital	-	14 (74)	< 0,05
Estatinas	11 (100)	4 (21)	< 0,05
Hidralazina	-	6 (32)	< 0,05
Clase funcional (NYHA) n (%)			
I	11 (100)	-	
II	-	2 (10)	
III	-	17 (90)	
IV	-	-	
FE	60 \pm 10	33 \pm 12	< 0,001
Tiempo postrasplante (meses)	20	-	

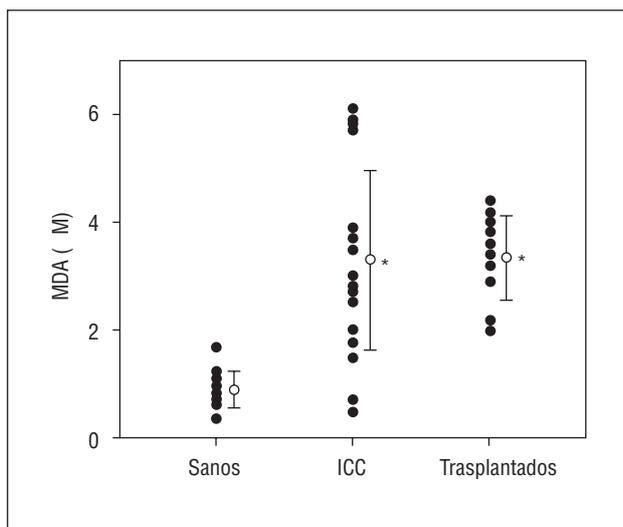


Fig. 1. Valores plasmáticos de malondialdehído (MDA) en sujetos controles (n = 14) y pacientes con ICC (n = 19) y trasplante cardíaco (n = 11). Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar. *p < 0,05 frente a control.

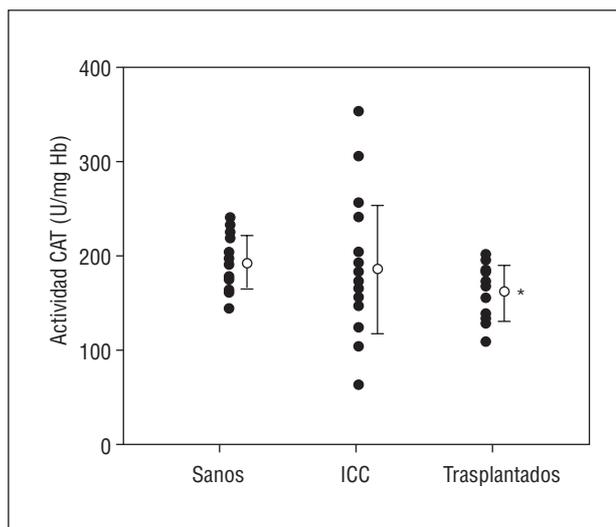


Fig. 3. Actividad plasmática de catalasa (CAT) en sujetos controles (n = 14) y pacientes con ICC (n = 19) y trasplante cardíaco (n = 11). Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar. *p < 0,05 frente a control.

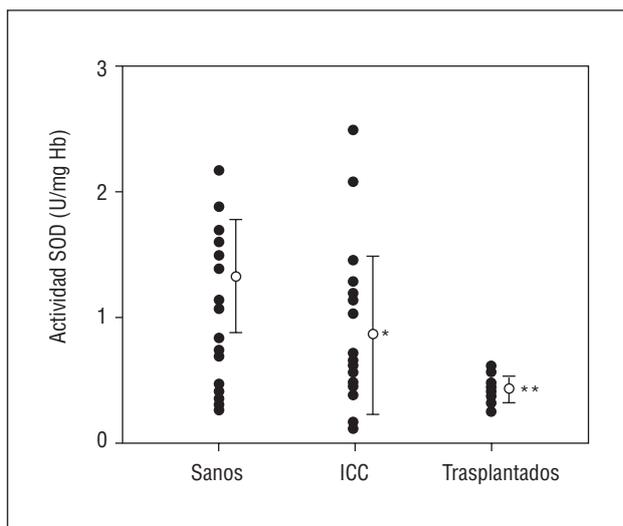


Fig. 2. Actividad plasmática de superóxido dismutasa (SOD) en sujetos controles (n = 14) y pacientes con ICC (n = 19) y trasplante cardíaco (n = 11). Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar. *p < 0,05 y **p < 0,05 frente a control e ICC, respectivamente.

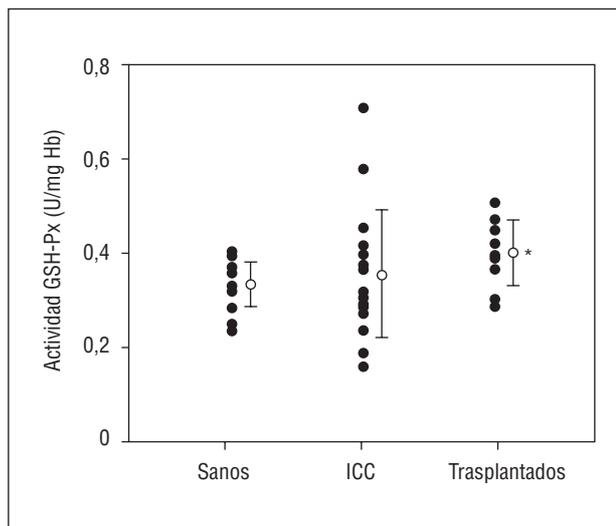


Fig. 4. Actividad plasmática de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sujetos controles (n = 14) y pacientes con ICC (n = 19) y trasplante cardíaco (n = 11). Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar. *p < 0,05 frente a control.

ciencia cardíaca. No hubo diferencias significativas en edad. Del grupo con ICC, cinco eran hipertensos, tres diabéticos, cuatro dislipidémicos y seis habían sufrido IAM. Trece pacientes utilizaban IECA (68%), 16 diuréticos (84%), y 14 digitálicos (74%). Ningún paciente era fumador en el momento del estudio. La FE fue de 33% en el grupo con ICC y de 60% en los trasplantados.

En la figura 1 se muestran los resultados de las determinaciones de MDA plasmático. Los valores de MDA se encontraron significativamente aumentados

en los pacientes con ICC y trasplante cardíaco respecto del grupo control ($3,27 \pm 1,7$; $3,35 \pm 0,8$, y $0,9 \pm 0,3$ M, respectivamente), sin existir diferencias significativas entre pacientes trasplantados y con ICC. Las figuras 2-4 muestran los resultados de la medición de las actividades plasmáticas de los sistemas antioxidantes SOD, CAT y GSH-Px, respectivamente. La actividad de SOD en el grupo trasplantado fue inferior respecto a los grupos ICC y control ($0,44 \pm 0,1$ frente a $0,87 \pm 0,6$; $1,3 \pm 0,4$ U/mg Hb, respectivamente; p < 0,05). No hubo diferencias significativas en la activi-

dad de CAT entre los grupos de ICC y trasplantados (187 ± 67 y 162 ± 31 U/mg Hb, respectivamente), aunque fue menor en trasplantados respecto al grupo control (193 ± 29 U/mg Hb; $p < 0,05$). Por otra parte, la actividad de GSH-Px fue superior en el grupo trasplantado respecto del grupo control ($0,40 \pm 0,07$ y $0,33 \pm 0,05$ U/g Hb; $p < 0,05$), mientras que no hubo diferencias significativas entre los grupos ICC y control.

DISCUSIÓN

El principal hallazgo de este estudio es que pacientes sometidos a trasplante cardíaco tienen un aumento del estrés oxidativo, evidenciado por una elevación en la concentración plasmática de MDA. Este aumento del estrés oxidativo es similar al encontrado en pacientes con ICC estable CF III de la NYHA y se observó en ausencia de episodios reconocidos de infección o rechazo.

La actividad de SOD se encuentra disminuida en los pacientes trasplantados respecto del grupo control, mientras que la actividad de GSH-Px se encontró aumentada postrasplante cardíaco respecto al grupo control. Por otro lado, no se observaron cambios significativos en la actividad de la CAT entre el grupo de los ICC y los trasplantados. Estos resultados muestran que existe un cambio en las actividades de los sistemas antioxidantes enzimáticos en pacientes con ICC y trasplantados, que en forma global lleva a un aumento en el estrés oxidativo.

La lipoperoxidación de las membranas es un proceso relativamente lento. Sin embargo, ciclos de isquemia reperusión recurrentes en el corazón y en el músculo esquelético y la autooxidación de las catecolaminas pueden aumentar la lipoperoxidación de las membranas. El resultante aumento del estrés oxidativo favorecería la transición hacia un estado caracterizado por depresión de la función cardíaca. Este aumento del estrés oxidativo se ha demostrado en pacientes con IC a través de una elevación en los valores plasmáticos de MDA³⁰. Un aumento del estrés oxidativo postrasplante cardíaco ha sido descrito en animales que presentan rechazo cardíaco agudo¹⁷. Chancerelle et al³¹ observaron valores aumentados de MDA en pacientes trasplantados sin evidencia de rechazo y esta peroxidación lipídica aumentada ha sido descrita como uno de los mecanismos responsables de aterogénesis acelerada postrasplante³². Recientemente, Schimke et al²³ evaluaron el estrés oxidativo en biopsias de tejido miocárdico en distintos períodos postrasplante cardíaco en pacientes sin rechazo agudo. Ellos observaron un aumento del MDA en los tres primeros meses postrasplante, una caída y un posterior incremento luego del primer año. El aumento en el estrés oxidativo en el primer período se atribuyó al procedimiento mismo del trasplante (isquemia del corazón donante, tiempo

isquémico y reperusión, infecciones virales o bacterianas)³³⁻³⁵. Los cambios en las membranas (lipoperoxidación) debido a un elevado estrés oxidativo pueden ser parcialmente responsables para esas manifestaciones de la enfermedad.

Basados en estudios en animales, Kirshenbaum y Singal³⁶ postularon que cuando se produce un aumento en la generación de radicales libres del oxígeno, los corazones en una respuesta adaptativa aumentan los sistemas de defensas enzimáticos. Así, el estrés oxidativo puede ser prevenido o minimizado. Sin embargo, esta respuesta adaptativa es limitada, produciéndose en etapas más avanzadas, como por ejemplo en la ICC, un déficit en los sistemas antioxidantes enzimáticos³⁷. Se ha reportado que la hipertrofia cardíaca en ratas y cobayas está asociada a una disminución del estado de estrés oxidativo y a un aumento en la reserva antioxidante^{11,12}, mientras que la ICC bajo condiciones agudas y crónicas está asociada a un aumento del estado de estrés oxidativo y a una reducida reserva antioxidante^{3,7}. Estos hechos son bastante interesantes, pues se ha sugerido que SOD y GSH-Px son los más importantes en la detoxificación de los metabolitos de las especies reactivas en el corazón³⁸. El SOD es la primera línea de defensa contra el daño mediado por radicales libres, y actúa aumentando los valores de H_2O_2 . El principal daño en la acumulación de H_2O_2 es la producción de la especie altamente reactiva radical hidroxilo, para la cual no existen sistemas fisiológicos de defensa, como resultado de esto, la CAT y GSH-Px llegan a ser las enzimas antioxidantes más cruciales en estos grupos de pacientes con baja actividad de SOD. Adicionalmente, un agotamiento en la actividad de los sistemas antioxidantes enzimáticos se puede producir por daño directo por radicales libres, puesto que se ha demostrado que H_2O_2 inactiva al SOD³⁹, y valores plasmáticos disminuidos de SOD se han encontrado en ratas postrasplante cardíaco¹⁸.

En el estudio de Schimke et al se demostró un aumento de las actividades de GSH-Px y SOD postrasplante. Sin embargo, después del primer año, la actividad de SOD tiende a caer, lo que coincide con el incremento del estrés oxidativo²³. En el presente estudio, junto con el aumento de las concentraciones plasmáticas de MDA, encontramos una elevación en la actividad de GSH-Px; sin embargo, la actividad de SOD estaba reducida, lo que se traduciría en una respuesta adaptativa insuficiente. Este estado de estrés oxidativo aumentado se ha demostrado en pacientes con IC a través de una elevación en los valores plasmáticos de MDA³². En una serie de pacientes con ICC refractaria, además de valores aumentados de MDA, nosotros demostramos una caída en la actividad de la GSH-Px (presentado en el XXII Congreso Anual de la Sociedad Europea de Cardiología, Amsterdam. Agosto 2000).

Dado que la CAT tiene más baja afinidad por H_2O_2 , se ha postulado que el sistema GSH-Px es la principal

ruta metabólica del H₂O₂ en el corazón. Sin embargo, la CAT permite a la célula descomponer H₂O₂ independiente de la concentración intracelular de glutatión, puesto que se ha demostrado que el contenido de tioles plasmáticos, un índice del estado oxidativo del medio extracelular, está reducido en pacientes con ICC⁴⁰. Por otro lado, Dieterich et al⁴¹ encontraron un aumento en la expresión de CAT en el corazón de pacientes con ICC en etapa final, considerándose que esta inducción es una respuesta compensatoria del corazón frente al elevado estrés oxidativo de estos pacientes, mientras que la actividad de la SOD y la GSH permaneció inalterada.

Limitaciones del estudio

Entre las limitaciones de nuestro estudio se cuenta el reducido número de pacientes objeto de estudio. Se trata de un estudio comparativo y no de seguimiento, por lo cual no existe demostración de los cambios atribuidos al trasplante cardíaco. No se evaluó el estrés oxidativo en el miocardio, sino en el plasma, con las limitaciones de extrapolar estos resultados a lo que sucede en el miocardio o reflejar lo que ocurre en otros órganos; aunque la sangre puede ser un reflejo de la capacidad de todo el organismo frente a condiciones de estrés oxidativo, y sus valores y actividades enzimáticas podrían expresar múltiples fuentes de estrés oxidativo, entre ellas el músculo estriado en insuficiencia cardíaca.

CONCLUSIÓN

Existe un estado de estrés oxidativo aumentado postrasplante cardíaco comparable al de sujetos con ICC estable CF III. Adicionalmente, se observa un aumento en la actividad antioxidante de GSH-Px con una importante caída en las actividades de SOD.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ho KKI, Pinsky J, Kannel W, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham study. *J Am Coll Cardiol* 1993;22(Suppl A):6-13.
2. Prasad K, Gupta J, Kalra J. Oxidative stress as a mechanism of cardiac failure in chronic volume overload in canine model. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:375-85.
3. Hill M, Singal P. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol* 1996;148:291-300.
4. Nishiyana Y, Ikeda H, Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J* 1998;135:115-20.
5. Singal P, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;40:426-32.
6. Ferrari R, Curello S, Ceconi C. Alterations of glutathione status during myocardial ischemia and reperfusion. En: Singal P, editor. *Oxygen radicals in the pathophysiology of the heart diseases*. Massachusetts: Kluwer Academic Press, 1988; p. 145-60.
7. Dhalla A, Singal P. Role of oxidative stress in the transition from hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:506-14.
8. Belch J, Bridges A, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and heart failure. *Br Heart J* 1991;65:245-8.
9. Burton K, McCord J, Ghai G. Myocardial alterations due to free-radical generation. *Am J Physiol* 1984;246:H776-H83.
10. McMurray J, Chopra M, Agarwal A. Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *Eur Heart J* 1993;14:1493-8.
11. Dhalla A, Singal P. Antioxidant changes in hypertrophied and failing guinea pigs hearts. *Am J Physiol* 1994;266:H1280-H5.
12. Gupta M, Singal P. Higher antioxidant capacity during chronic stable heart hypertrophy. *Circ Res* 1989;64:398-406.
13. Kirshenbaum L, Singal P. A relative deficit in antioxidant reserve may contribute to cardiac failure. *Can J Cardiol* 1990;6:47-9.
14. Ghatak A, Brar M, Agarwal A. Oxygen free radical system in heart failure and therapeutic role of oral vitamin E. *Int J Cardiol* 1996;57:119-27.
15. Kukin M, Kalman J, Charney R, Levy D, Buchholz-Varley C, Ocampo O, et al. Prospective, randomized comparison of effect of long-term treatment with metoprolol or carvedilol on symptoms, exercise, ejection fraction, and oxidative stress in heart failure. *Circulation* 1999;99:2645-51.
16. Castro P, Bourge R, Jalil J, Martínez J. Selección y evaluación de pacientes candidatos a trasplante cardíaco. *Rev Esp Cardiol* 1999;52:604-16.
17. Coles J, Romaschin A, Wilson G, Mickle D, Dasmahapatra H, Martell M, et al. Oxygen free radical-mediated lipid peroxidation injury in acute cardiac allograft rejection. *Transplantation* 1992;54:175-8.
18. Kloc M, Mailer K, Stepowski S. Superoxide dismutase decrease in cardiac transplants. *Transplantation* 1986;41:794-6.
19. Roza A, Pieper G, Moore-Hilton G, Johnson C, Adams M. Free radicals in pancreatic and cardiac allograft rejection. *Transpl Proc* 1994;26:544-55.
20. Sobotka P, Gupka D, Lansky D, Costano M, Zarling E. Breath pentane is a marker of acute cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 1994;13:224-9.
21. Auer T, Khoschsour G, Rabl H, Iberer F, Petutsching B, Wasler A, et al. Detection of lipid peroxidation products by malondialdehyde (MDA-TBA reaction) in organ transplantation. *Transpl Proc* 1995;27:2749-51.
22. Calo L, Semplicini A, Davis P, Bonvicini P, Cantaro S, Rigotti P, et al. Cyclosporin induced endothelial dysfunction and hypertension: are nitric oxide system abnormality and oxidative stress involved? *Transpl Int* 2000;13(Suppl 1):S413-S8.
23. Schimke I, Schikora M, Meyer R, Dübel H, Modersohn D, Kleber F, et al. Oxidative stress in the human heart is associated with changes in the antioxidative defense as shown after heart transplantation. *Mol Cell Biochem* 2000;204:89-96.
24. Billingham M, Cary N, Hammond M, Kemnitz J, Marboe C, McCallister H, et al. A working formulation for the standardization of the nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. *J Heart Lung Transplant* 1990;9:587-93.
25. Díaz-Araya G, Naranjo L, Godoy L, Squella J, Letelier M, Nuñez-Vergara L. Antioxidants effects of 1,4-dihidropiridina and nitroso aril derivatives on brain cerebral slices. *Gen Pharmacol* 1998;31:385-91.
26. McCord J, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;22:6049-55.
27. Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-5.
28. Beers R, Sizer I. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952;195:133-40.

29. Paglia D, Valentine W. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
30. Díaz-Velez C, García-Castineiras S, Mendoza-Ramos E. Increased malondialdehyde in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1996;131:146-52.
31. Chancerelle Y, de Lorgeril M, Viret R, Chiron B, Dureau G, Renaud S, et al. Increased lipid peroxidation in cyclosporin-treated heart transplant recipients. *Am J Cardiol* 1991;68:813-6.
32. De Lorgeril M, Richard M, Arnaud J, Boissonnat P, Guidollet J, Renaud S. Lipid peroxides and antioxidant defenses in accelerated transplantation-associated coronary arteriosclerosis. *Am Heart J* 1993;125:974-80.
33. Bondo K, Senoo Y. Oxygen derived free radical damage in canine heart transplantation. *J Surg Res* 1989;46:152-6.
34. Jansen M, Kostmer J, Bos E, De Jong J. Malondialdehyde and glutathione production in isolated perfused human and rat hearts. *Circ Res* 1993;73:681-8.
35. Schwarz K. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic Biol Med* 1996;21:641-9.
36. Kirshenbaum L, Singal P. Changes in antioxidant enzymes in isolated cardiac myocytes subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lab Invest* 1992;67:796-803.
37. Ball S, Solé J. Oxidative stress and pathogenesis of the heart failure. *Cardiol Clinic* 1998;16:665-75.
38. Dorosshow JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites. *J Clin Invest* 1980;65:128-35.
39. Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: state of art. *Am J Med* 1991;5:277-88.
40. Belch JFF, Bridges AB, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J* 1991;65:245-8.
41. Dieterich S, Bieligg U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene expression of antioxidants enzymes in failing heart. *Circulation* 2000;101:33-9.