



ORIGINAL BREVE

# Óxido nítrico: ¿un posible nuevo biomarcador en insuficiencia cardíaca? Relación con hipertensión pulmonar secundaria a insuficiencia cardíaca izquierda



Roberto Jorge Bonafede<sup>a</sup>, Juan Pablo Calvo<sup>b</sup>, Julia María Valeria Fausti<sup>c</sup>,  
Sonia Puebla<sup>d</sup>, Adolfo Juan Gambarte<sup>e,f</sup> y Walter Manucha<sup>a,g,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Insuficiencia Cardíaca, Hospital Central, Mendoza, Argentina

<sup>b</sup> Laboratorio de Farmacología Experimental Básica y Traslacional, Área de Farmacología, Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo, Mendoza, Argentina

<sup>c</sup> Sección Ecocardiografía, Servicio de Cardiología, Hospital Central, Mendoza, Argentina

<sup>d</sup> Servicio de Nutrición, Hospital Central, Mendoza, Argentina

<sup>e</sup> Servicio de Cardiología, Hospital Luis Lagomaggiore, Mendoza, Argentina

<sup>f</sup> Área de Medicina Interna, Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo, Mendoza, Argentina

<sup>g</sup> Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo, Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (IMBECU-CONICET), Mendoza, Argentina

Recibido el 15 de noviembre de 2016; aceptado el 20 de diciembre de 2016

Disponible en Internet el 5 de abril de 2017

## PALABRAS CLAVE

Insuficiencia  
cardíaca;  
Biomarcadores;  
Hipertensión  
pulmonar

**Resumen** La insuficiencia cardíaca (IC) es un creciente problema médico por lo que resulta de interés el estudio de nuevos biomarcadores para su mejor caracterización, y en este sentido, evaluamos productos metabólicos (nitritos y nitratos) del óxido nítrico, especies reactivas del oxígeno (ROS), NADPH y superóxido dismutasa (SOD) y su posible valor predictivo en pacientes con IC. Además, estudiamos potenciales diferencias entre pacientes con y sin hipertensión pulmonar secundaria (HPS), considerados de peor pronóstico. En IC, demostramos disminución significativa de los niveles plasmáticos de nitritos y nitratos y SOD, mientras que ROS y NADPH se encontraban incrementados. Estos resultados concuerdan con los cambios fisiopatológicos propios de la IC. También demostramos en pacientes con IC e HPS que los niveles plasmáticos de nitritos y nitratos así como SOD estaban disminuidos respecto a IC sin HPS, mientras que ROS y NADPH estaban aumentados. Por lo tanto, nuestros resultados indican que óxido nítrico, ROS, NADPH y SOD podrían ser considerados como posibles marcadores en IC y además permitirían caracterizar a los pacientes con HPS.

© 2017 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [wmanucha@yahoo.com.ar](mailto:wmanucha@yahoo.com.ar) (W. Manucha).

**KEYWORDS**

Heart failure;  
Biomarkers;  
Pulmonary  
hypertension

**Nitric oxide: A new possible biomarker in heart failure? Relationship with pulmonary hypertension secondary to left heart failure**

**Abstract** Heart failure (HF) is a growing medical problem and it is of interest to study new biomarkers for better characterisation. In this sense, nitric oxide, reactive oxygen species (ROS), NADPH, and superoxide dismutase (SOD) were evaluated, along with their possible predictive value in patients with HF. An analysis was also performed on the potential differences between patients with and without secondary pulmonary hypertension (SPH), considered to have a worse prognosis. A significant decrease of nitric oxide and SOD was noted in HF, whereas ROS and NADPH were increased. These results agree with the pathophysiological changes characteristic of HF. It was also demonstrated that in patients with HF and SPH that nitric oxide and SOD were decreased when compared to HF without SPH, whereas ROS and NADPH were increased. Therefore, our results suggest that nitric oxide, ROS, NADPH, and SOD, could be considered as possible markers in HF, and could also characterise patients with SPH.

© 2017 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

**Introducción**

El presente trabajo abordó la insuficiencia cardíaca (IC) desde la perspectiva de la determinación de posibles nuevos biomarcadores como el óxido nítrico (NO) y otros relacionados, tales como las especies reactivas del oxígeno (ROS), NADPH oxidasa y superóxido dismutasa (SOD), en un momento de la evolución de la enfermedad. Se destaca específicamente que determinamos niveles plasmáticos de nitritos y nitratos como índice de la producción sistémica de NO; mientras que cuando estudiamos las ROS, este se refiere de forma indirecta a la suma de los productos conocidos como radicales superóxido e hidroxilo.

De especial interés es que la IC es un creciente problema médico, sanitario y socioeconómico principalmente en los países en desarrollo, y que fue claramente definida más de 2 décadas atrás por Braunwald (1992) como el estado fisiopatológico en el cual una anomalía de la función cardíaca es responsable de la falla del corazón para bombear sangre a una velocidad apropiada según los requerimientos del metabolismo celular. Por otro lado, más recientemente fueron introducidos aquellos elementos que contribuyen al diagnóstico y/o pronóstico de esta enfermedad. Así, los denominados biomarcadores se definen como variables biológicas que dan información sobre enfermedades concretas. En este sentido y con especial atención a la IC, son muchas las moléculas estudiadas tales como marcadores neurohumorales, inflamatorios, de estrés oxidativo, de remodelado de matriz intersticial y de lesión miocitaria, entre otros<sup>1</sup>. Dentro de los sistemas neurohumorales evaluados hasta ahora en IC publicados por Richards en 2009<sup>1</sup> y Braunwald<sup>2</sup>, se destacan el sistema renina-angiotensina-aldosterona, sistema nervioso adrenérgico, arginina-vasopresina y péptidos derivados de endotelina.

Sin embargo, el uso de estos marcadores en la práctica clínica así como los fármacos que se indican resultan costosos y de difícil acceso para el paciente, principalmente en el ámbito de la salud pública. Por otro lado, y de interés para el presente artículo, un sistema con importante participación en el desarrollo del síndrome de IC como

es el del NO no ha sido evaluado suficientemente desde la perspectiva de constituirse como un posible biomarcador, y por lo tanto es aún tema pendiente de estudio. En este sentido, han sido propuestos una serie de marcadores de vías de señalización del NO, pero la utilidad clínica ha resultado limitada porque las técnicas no han sido optimizadas.

Conforme con estos antecedentes, nuestro grupo de trabajo propuso evaluar el NO en la IC crónica (ICC) mediante la determinación de sus productos metabólicos finales: nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ); también determinamos 2 de las ROS más relevantes como son el oxhidrilo ( $\text{HO}\cdot$ ) y anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). Además, estudiamos la actividad de las enzimas NADPH oxidasa y SOD.

Durante la ICC se desarrolla una disfunción endotelial que compromete especialmente a las arterias periféricas lo que produce incapacidad del vaso para dilatarse como respuesta al incremento del flujo sanguíneo. En este sentido, no se conoce completamente el mecanismo completo por el cual ocurre este fenómeno, sin embargo, han sido postuladas 3 hipótesis<sup>3</sup> que intentan explicarlo y que incluyen la reducción en la disponibilidad del sustrato para la óxido nítrico sintasa, disminución en la síntesis de NO e inactivación extracelular de NO por el anión superóxido. Por lo tanto, el NO desempeña un papel protagónico.

En pacientes con falla cardíaca crónica se ha demostrado un incremento en la producción de radicales libres de oxígeno, en particular el anión superóxido, condicionando un importante estrés oxidativo caracterizado por un exceso relativo de ROS en relación con mecanismos de defensa endógenos. Al respecto, existe abundante evidencia que ha demostrado el papel de las ROS, junto con las especies reactivas del nitrógeno en la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular, incluyendo la IC<sup>3</sup>. En los últimos tiempos han sido evaluados varios marcadores de estrés oxidativo como predictores del daño funcional. De particular interés, recientemente también se ha caracterizado el deterioro de las vías de señalización del NO, asociado en algún caso a peor pronóstico y mortalidad. No obstante, su utilidad clínica ha resultado limitada<sup>4</sup>.

De relevancia, la mayor producción del  $O_2$  conduciría a una inactivación del NO originando peroxinitritos, que aunque menos tóxico que el  $O_2^{\cdot-}$ , también contribuiría a la disfunción endotelial de múltiples formas incluida la disminución de la biodisponibilidad del NO y por lo tanto de la vasodilatación<sup>5</sup>. Por otro lado, la mayor actividad de la enzima NADPH oxidasa resulta uno de los sistemas más eficientes productores de ROS en la IC. Además, la actividad de la NADPH oxidasa está altamente implicada en la inducción de la apoptosis como consecuencia de la gran producción de  $O_2^{\cdot-}$ . Así, el daño celular por estrés oxidativo ocurre, entre otras variables, cuando las ROS se acumulan en exceso y superan a los mecanismos de defensa celulares. Por su parte, la enzima SOD cataliza la dismutación de  $O_2^{\cdot-}$  en oxígeno y peróxido de hidrógeno<sup>6</sup>. Este mecanismo justifica su importante participación como defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno. Esta vía metabólica aún no ha sido suficientemente analizada como proveedora de biomarcadores en esta enfermedad.

Al respecto, se han investigado distintos sistemas neurohumorales para identificar biomarcadores como candidatos a ser buenos predictores, pero pocos cumplen con los criterios de utilidad clínica y resultan además costosos. Surge entonces la necesidad de encontrar nuevos marcadores que sean un aporte superador al conjunto de los ya estudiados.

Por lo tanto, la hipótesis central del presente trabajo surge de la presunción de que los valores plasmáticos de nitritos y nitratos (NO) resultan menores en pacientes con ICC. Además, otro supuesto es que los pacientes que tienen hipertensión pulmonar secundaria con presión pulmonar (PP) > 40 mmHg presentan menores niveles de nitritos y nitratos respecto a los que tienen una PP < 40 mmHg. También proponemos que estos enfermos presentarían concentraciones mayores de hidroxilo y superóxido (ROS), mayor actividad del sistema NADPH, pudiéndose de esta manera inactivar al NO disponible; y agravando el cuadro, una menor actividad de SOD con una clara implicancia en la menor catalización de anión superóxido. Finalmente, la concreción de estos postulados nos permitiría aportar, entre otros elementos de interés, al objetivo clave de encontrar nuevos biomarcadores en IC como predictores de evolución de la ICC con especial relación al desarrollo o no de hipertensión pulmonar secundaria.

## Material/Pacientes y métodos

En el diseño de este trabajo se tuvieron en cuenta los principios básicos de la bioética. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Central de Mendoza. Previamente a la protocolización se hizo firmar el consentimiento informado a cada paciente. Incluimos a 30 pacientes (edad promedio  $53 \pm 7,43$ ; 7 mujeres (23%) y 23 hombres (93%), que fueron separados en grupos según sus valores de presión sistólica pulmonar (PSP) medida por ecocardiograma doppler. Grupo A (PSP  $\geq 40$  mmHg) con 13 enfermos (43%) y grupo B (PSP < 40 mmHg) con 17 enfermos (57%). El corte de PSP se hizo en 40 mmHg y no en 30 mmHg (considerado como máximo normal). De este modo, dejamos un margen de error de 10 mmHg teniendo en cuenta la variabilidad del método.

El estudio fue observacional, transversal con enfermos protocolizados según criterios de inclusión y exclusión en número aún no suficiente por tratarse de un estudio preliminar.

Los pacientes estudiados fueron concurrentes a la Unidad de Insuficiencia Cardíaca del Hospital Central de Mendoza. A la mayoría se les realizaron: determinaciones bioquímicas generales, ECG, radiografía de tórax, ecocardiograma y test de caminata de 6 minutos. Además, y con dieta previa (24h) pobre en precursores de NO (nitritos y nitratos), se les analizó en muestra de sangre venosa los siguientes marcadores:

### Nitritos y nitratos

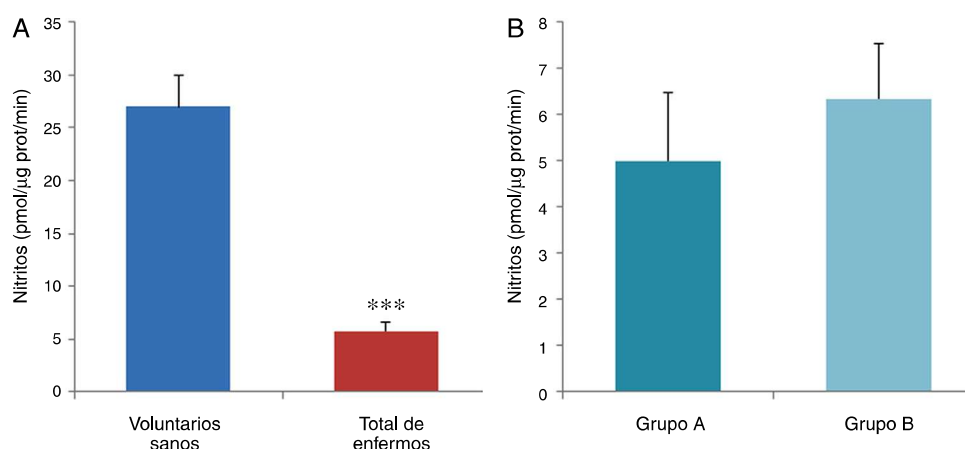
Antes de proceder a la determinación de NO, se desproteinizó cada muestra de sangre a los efectos de optimizar el ensayo. Para esta metodología se utilizó ácido tricloroacético al 5%. Luego se centrifugó y se tomó el sobrenadante para luego volver a centrifugar las muestras a 6.400 rpm durante 20 min; se separó el sobrenadante para determinar por el método de Griess la producción de nitritos (compuesto estable metabólico del NO). La cantidad de nitritos se corrigió a la proteína de cada muestra. La proteína se determinó por el método de Bradford usando albúmina como testigo. La cuantificación de los nitritos se realizó en espectrofotómetro a 540 nm y los resultados se expresaron como pmol de nitritos generados por microgramo de proteína por minuto de incubación.

### Especies reactivas del oxígeno (radicales libres $HO^{\cdot}$ y anión superóxido)

La sal monoamónica del ácido 5,5'-nitrido dibarbitúrico de color violeta en presencia de radicales  $HO^{\cdot}$  y  $O_2^{\cdot-}$  se convierte en un derivado aloxánico incoloro y la disminución de ese color es proporcional a los radicales presentes y producidos. Los mismos se cuantificaron espectrofotométricamente a 515 nm<sup>6</sup>.

### Actividad de NADPH oxidasa

La actividad de NADPH oxidasa se midió en las muestras usando la técnica del luminol (5-amino-2, 3-dihydro-1,4-phthalazine, Sigma-Aldrich). Las muestras se homogeneizaron y centrifugaron a 6.000 rpm por 30 min. El sobrenadante se separó y centrifugó nuevamente, esta vez a 19.500 rpm, y la concentración de proteínas de la fracción de membrana lisada se cuantificó por el ensayo Lowry usando albúmina sérica bovina como testigo. Una muestra (40  $\mu$ l) de fracción fue rápidamente leída en el espectrofluorómetro (FluoroCount<sup>TM</sup>; AF10001, Cambers Company, EE. UU.) para establecer el valor basal de cada muestra. Luego, 2  $\mu$ l de  $\beta$ -NADH (Sigma) 0,1 mmol/l y 2  $\mu$ l de luminol 5  $\mu$ mol/l en dimetil sulfóxido se incorporaron y leyeron por 10 min (360 nm excitación y 460 nm emisión). Los valores se expresaron en unidades fluorescentes relativas por microgramos de proteína y por minuto de incubación.



**Figura 1** Determinación de NO en plasma mediante la técnica de Griess.  
A-Comparación entre voluntarios sanos versus el total de los enfermos con IC.  
B-Comparación entre enfermos del grupo A versus los enfermos del grupo B.

### Actividad de superóxido dismutasa

La autooxidación alcalina del 5, 6, 6a, 11 b-tetrahidro-3,9,10-trihidro Benzo (c) fluoreno ( $R_1$ ) es acelerada por la SOD, formando un cromógeno con un máximo de absorbancia a 525 nm. Además, se utilizó el 1,4,6-trimetil-2-vinilpiridina ( $R_2$ ) que elimina la mayor cantidad de interferentes en las muestras, causados normalmente por mercaptanos tales como el glutatión reducido, atrapando los mercaptanos por una reacción de alquilación<sup>7</sup>.

### Recolección de datos y estadística

El instrumento de recolección de datos fue el «Formulario de inclusión de pacientes». Los resultados se expresaron como porcentajes para variables categóricas y como media con su desvío estándar para las continuas. Se utilizó el t-test pareado para comparar la totalidad de los pacientes portadores de IC frente a 8 voluntarios sanos (comparación que pasó el test de normalidad de p). Para comparar ambos grupos (A y B) entre sí, se utilizó el programa GraphPad InStat 3<sup>®</sup> para realizar las operaciones estadísticas correspondientes, se consideró diferencia estadísticamente significativa con una  $p < 0,05$ .

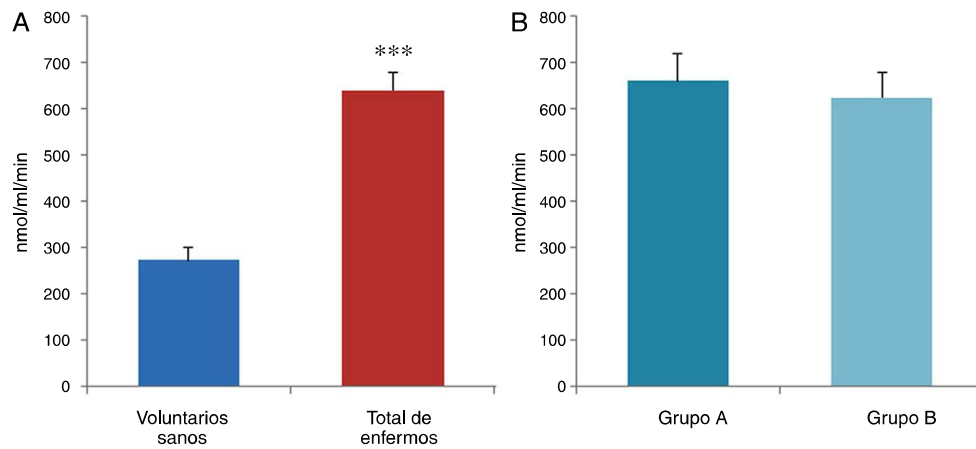
### Resultados

Los datos utilizados para el análisis estadístico fueron la PSP (mmHg) y los valores de niveles plasmáticos de nitritos y nitratos (NO), anión superóxido y oxidrilo (ROS), NADPH oxidasa y SOD, expresados como pmol de nitritos/μg de proteína/min, nmol/ml/min incubación, unidades fluorescentes relativas/μg proteína/min incubación y U/ml, respectivamente. Los valores de referencia, tomados de 8 voluntarios sanos fueron:  $27 \pm 2,38$ ;  $274 \pm 28$ ;  $67 \pm 10$  y  $24 \pm 5,39$ , respectivamente. En el grupo A la media de PSP fue  $46 \pm 4$  mmHg mientras que para el grupo B fue de  $31 \pm 5$  mmHg. En tanto que los valores hallados para todos los enfermos (grupo A+grupo B) de nitritos, ROS, NADPH oxidasa y SOD fueron:  $5,73 \pm 0,93$ ;  $641 \pm 39$ ;  $292,66 \pm 29,5$

y  $7 \pm 0,77$ , respectivamente. Cuando se compararon estos valores con los voluntarios sanos, las diferencias fueron muy significativas para nitritos ( $p < 0,0001$ ) (fig. 1A); también para ROS ( $p < 0,0069$ ) (fig. 2A); para NADPH oxidasa ( $p < 0,0092$ ) (fig. 3A); y para SOD ( $p < 0,0018$ ) (fig. 4A). Por otro lado, las medias con su correspondiente error estándar medio para cada grupo fueron en grupo A:  $5 \pm 1,47$ ;  $661 \pm 59,34$ ;  $320 \pm 38$  y  $7 \pm 1,25$ , respectivamente; y en grupo B:  $6,35 \pm 1,21$ ;  $625,58 \pm 53,37$ ;  $301 \pm 41$  y  $7,32 \pm 1$ , respectivamente. Cuando se parearon estos valores entre ambos grupos (A versus B), los resultados fueron acorde a lo esperado demostrando una clara tendencia aunque sin diferencias significativas para nitritos (fig. 1B), ROS (fig. 2B), NADPH oxidasa (fig. 3B) y SOD (fig. 4B).

### Discusión

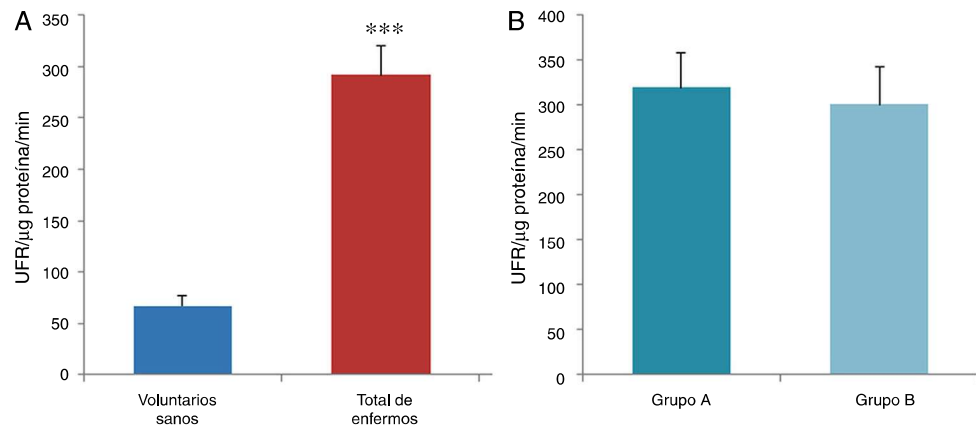
Los resultados del presente trabajo confirmarían previas evidencias y demostrarían además que en la IC se producen una serie de cambios humorales y enzimáticos relacionados entre sí. Específicamente demostramos aumento de la actividad NADPH oxidasa –principal fuente productora de ROS como consecuencia de la mayor síntesis del anión superóxido– y que estaría relacionada directamente con la estimulación del sistema renina-angiotensina. Por otro lado, determinamos una manifiesta menor biodisponibilidad de NO (menores niveles de nitritos y nitratos) debido, entre otros elementos, a la probable inactivación mediada por el propio anión superóxido. Por su parte, el producto de la unión del anión superóxido con el NO produciría el reconocido peroxinitrito, de naturaleza también tóxica, y que contribuye significativamente a la disfunción endotelial de múltiples formas incluida la disminución de la accesibilidad del NO. Eventos que favorecerían un mayor deterioro del mecanismo de vasodilatación con el consecuente daño tisular. En adición, a la incapacidad del vaso para dilatarse como respuesta al incremento del flujo sanguíneo se le sumaría una rápida eliminación plasmática del NO debido a su posible inactivación por combinación con la hemoglobina<sup>8</sup>. De especial interés es que pudimos establecer reducción de la actividad SOD, dato relevante en pacientes con significativo



**Figura 2** Determinación de ROS en plasma.

A-Comparación entre voluntarios sanos versus el total de los enfermos con IC.

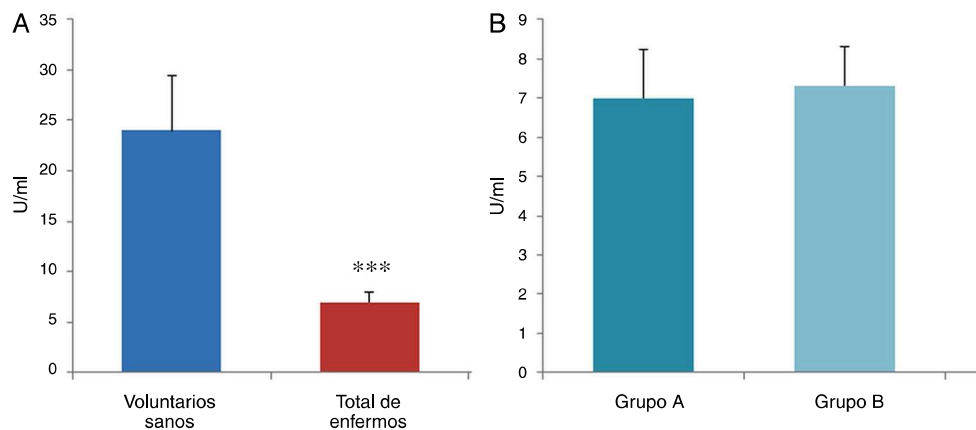
B-Comparación entre enfermos del grupo A versus los enfermos del grupo B.



**Figura 3** Determinación de NADPH oxidasa en plasma.

A-Comparación entre voluntarios sanos versus el total de los enfermos con IC.

B-Comparación entre enfermos del grupo A versus los enfermos del grupo B.



**Figura 4** Determinación de SOD en plasma.

A-Comparación entre voluntarios sanos versus el total de los enfermos con IC.

B-Comparación entre enfermos del grupo A versus los enfermos del grupo B.



estado oxidativo, en donde, la mayor producción del anión superóxido como consecuencia de una incrementada actividad de la NADPH oxidasa estaría altamente implicada en la inducción de apoptosis y fibrosis.

Por otro lado, y de particular relevancia para el presente estudio, existe abundante evidencia que sustenta el concepto de que el NO tiene acción selectiva sobre la circulación pulmonar, lo cual robustece nuestro postulado central. Es destacable el hecho de que el GMP cíclico –segundo mensajero del NO– es degradado por la fosfodiesterasa 5 también en la vasculatura pulmonar<sup>9</sup>. Además, la inhalación de NO produce en la mayoría de los pacientes una rápida mejoría de la oxigenación, induciendo una vasodilatación arteriolar pulmonar. En adición, también existe evidencia que muestra la eficacia en circulación pulmonar de fármacos que inhiben la fosfodiesterasa 5 (como sildenafil) respecto a la vasculatura sistémica. Los efectos del NO inhalado en la circulación pulmonar fueron descritos hace más de 2 décadas. Experimentalmente se verificó que el NO inhalado producía vasodilatación pulmonar selectiva al reducir la presión arterial pulmonar sin modificar la presión arterial sistémica ni el gasto cardíaco<sup>10</sup>, esto es consistente con datos sobre la eficacia de fármacos que inhiben la fosfodiesterasa 5 en circulación pulmonar respecto a la vasculatura sistémica, razón por la cual se utilizan exitosamente en pacientes con hipertensión pulmonar idiopática (grupo 1, clasificación Niza). Del mismo modo, otros fármacos como nebivolol, nitroprusiato de sodio, nitroglicerina, dinitrato de isosorbide y 5-mononitrato de isosorbide, S-nitrosotioles, antiinflamatorios no esteroideos, antagonistas de los canales de calcio dihidropiridínicos, antioxidantes en las LDL (alfa tocoferol) y en el fluido extracelular (vitamina C) y L-arginina, también aumentan la síntesis de NO en la circulación pulmonar.

No obstante el conocimiento actual y transcurridos más de 20 años desde la identificación de las funciones del NO endógeno, resultan infructuosos los intentos por generar nuevas estrategias terapéuticas, reflejando un conocimiento de progreso muy lento y en donde además se investigaron posibles biomarcadores relacionados pero sin obtener evidencia sólida de ellos.

La información recabada sobre la relación NO-circulación pulmonar nos aporta un rico sustrato mecanístico para proponer nuevas investigaciones sobre biomarcadores y sus implicancias en el diagnóstico, pronóstico y eventual nuevo tratamiento que permita disminuir la PP en IC. En este sentido, nuestro grupo de trabajo consideró el efecto del NO sobre la circulación pulmonar y que su síntesis estaría disminuida durante la IC en general, y probablemente más en la IC con hipertensión pulmonar (grupo 2, clasificación Niza). Así, los resultados obtenidos en el presente trabajo y mediante los métodos bioquímicos descriptos demuestran hasta este punto de nuestra investigación que en todos los pacientes estudiados los productos finales del NO (nitratos/nitritos) y la actividad SOD, están disminuidos. Por el contrario, las ROS (radicales libres superóxido y oxidrilo) y actividad de la enzima NADPH oxidasa están aumentadas, siendo estos los resultados esperados.

Los autores consideran que este trabajo tiene limitaciones metodológicas y de diseño. Una es respecto a cómo medimos la PP. El Hospital Central de Mendoza cuenta con Servicio de Hemodinamia, pero por razones presupuestarias

ha sido restringida la realización de cateterismo derecho. Por otro lado, el diseño del protocolo no permitía grandes dilaciones en gestión y tuvimos que citar a los pacientes, la menor cantidad de veces posible (era necesario también que no fuera invadido). Por lo tanto, la medición del principal parámetro hemodinámico, la PP, debió hacerse con ecocardiograma doppler. En este sentido, la hipertensión pulmonar se define como presión pulmonar media > 25 mmHg, dato que debería ser obtenido por registro directo mediante cateterismo derecho, sin embargo se determinó la PP midiendo en forma indirecta la PSP por ecocardiograma doppler, definiendo hipertensión pulmonar como PSP > 40 mmHg. Indudablemente el registro directo de la PP es más adecuado que el obtenido en forma indirecta, pero el ecocardiograma doppler es un método sensible para medir PSP y ventajoso por resultar no invasivo. Las mediciones no cruentas fueron comparadas con registros simultáneos hechos por cateterismo derecho. Las estimaciones de PSP fueron hechas en el 89% de los pacientes con alta seguridad ( $r=0,97$ )<sup>11</sup>. Otra limitación, por razones operativas del Hospital Central de Mendoza, fue que los ecocardiogramas no fueron efectuados por el mismo operador.

Datos de algunos pacientes (caminata de 6 minutos, ecocardiograma, laboratorio general), no pudieron obtenerse por diversos inconvenientes, sin embargo este hecho no afectó la búsqueda del objetivo central propuesto ni los resultados obtenidos, y en este sentido podemos afirmar que el conjunto de datos nos informan acerca de pacientes crónicos con severo deterioro estructural y buena clase funcional por respuesta al tratamiento.

Finalmente, y en cuanto al diseño, hubiera sido preferible un seguimiento prospectivo longitudinal que permitiera evaluar el comportamiento de estos marcadores en el tiempo, tarea pendiente para nuestro grupo y otros en el futuro.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

## Agradecimientos

Los autores reconocen y agradecen los aportes y estudios estadísticos realizados por la Dra. Elcira Maneschi.

## Bibliografía

1. Richards AM. What we may expect from biomarkers in heart failure. *N Engl J Med.* 2009;5:463–70.
2. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med.* 2008;358:2148–59.

3. Guyton A. *Tratado de fisiología médica*. 9.a ed México DF: editorial Interamericana McGraw-Hill; 1998.
4. Trachtenberg BH, Hare JM. Biomarkers of oxidative stress in heart failure. *Heart Fail Clin*. 2009;5:561–77.
5. Tawfik HE, Cena J, Schulz R, Kaufman S. Role of oxidative stress in multiparity-induced endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H1736–42.
6. Torreilles J, Guerin M. Murexide bleaching: A new direct assay method for characterizing oxygen species. *Biochimie*. 1990;71:1231–4.
7. Nebot C, Moutet M, Huet P, Xu JZ, Yadan JC, Chaudiere J. Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Anal Biochem*. 1993;214:442–51.
8. Deem S. Nitric oxide scavenging by hemoglobin regulates hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Free Radic Biol Med*. 2004;36:698–706.
9. Movsesian M, Stehlik J, Vandeput F, Bristow MR. Phosphodiesterase inhibition in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2009;14:255–63.
10. Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, Jones R, Zapol WM. Inhaled nitric oxide: A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation*. 1991;83:2038–47.
11. Stevenson JG. Comparison of several noninvasive methods for estimation of pulmonary artery pressure. *J Am Soc Echocardiogr*. 1989;157–71.