

Influencia del estrés oxidativo en la evolución de la aterosclerosis carotídea

Influence of oxidative stress on the progression of carotid atherosclerosis

10.20960/angiologia.00494

12/28/2023

Influencia del estrés oxidativo en la evolución de la aterosclerosis carotídea

Influence of oxidative stress on the progression of carotid atherosclerosis

M.^a Lourdes del Río-Solá¹, Rita Losa-Rodríguez², Beatriz Aguirre-Gervás³, Hugo Gonzalo-Benito⁴

¹Servicio de Angiología, Cirugía Vascular y Endovascular. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Valladolid. ²Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Santiago Apóstol. Miranda de Ebro, Burgos. ³Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Valladolid. ⁴Instituto de Ciencias de la Salud de Castilla y León. Valladolid

Correspondencia: M.^a Lourdes del Río-Solá. Servicio de Angiología, Cirugía Vascular y Endovascular. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Avda. Ramón y Cajal, 3. 47003 Valladolid.

e-mail: lrio@saludcastillayleon.es

Recibido: 04/01/2023

Aceptado: 19/09/2023

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

RESUMEN

Introducción y objetivo: el estrés oxidativo (EO) ha demostrado una clara influencia en el desarrollo de las placas de ateroma por los daños provocados en el endotelio vascular. El objetivo de este trabajo es realizar un estudio de los principales marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedad aterosclerótica de la arteria carótida como signo de vulnerabilidad, analizar la implicación de la

situación redox y el estado metabólico mitocondrial en la patología aterosclerótica de la arteria carótida y su relación con la clínica neurológica.

Pacientes y métodos: se estudiaron las placas de ateroma obtenidas de pacientes intervenidos de endarectomía carotídea (asintomáticos y sintomáticos) en el Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Clínico Universitario de Valladolid en el año 2020. Se recogieron variables clínicas y demográficas y la existencia de sintomatología neurológica. Las características anatómicas y hemodinámicas se estudiaron mediante estudio eco Doppler y angiografía mediante tomografía computarizada (CTA) en el preoperatorio. Se analizaron las placas de ateroma como estimadores del grado de peroxidación lipídica que reflejaron el estado redox. Se ha estimado un tamaño muestral de 45 muestras en cada grupo, con una tasa de pérdidas de seguimiento del 5 %. Se estudiaron las diferencias entre los grupos mediante χ^2 y la t de Student para determinar la relación entre el potencial redox con las características morfológicas de la placa de ateroma. Se utilizó el programa estadístico SPSS 27.0, aceptando como significativo un valor $p < 0,05$.

Resultados: las placas de ateroma calcificadas mostraron mayor capacidad antioxidante con respecto a las placas de ateroma no calcificadas en el parámetro ABTS: 2,2-ácido-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (2635,08 frente a 2803,28). La relación es estadísticamente significativa ($p = 0,007$). También mostraron mayor defensa antioxidante tanto cuando se analizó la actividad de la catalasa (160,73 frente a 175,13) y la actividad SOD (1,11 frente a 1,49; $p = 0,049$). En el estudio del metabolismo energético de las placas carotídeas de ateroma objetivamos que los niveles de lactato fueron mayores en las placas no calcificadas (11,45 frente a 8,57; $p = 0,001$). Los niveles plasmáticos de ácido úrico (1,48 frente a 2,33) y la actividad de la catalasa (146,79 frente a 176,81) fueron

significativamente más elevados en los pacientes con sintomatología neurológica ($p = 0,001$ y $0,025$, respectivamente).

Conclusiones: las placas homogéneas de ateroma y calcificadas de la arteria carótida presentan mayor capacidad y defensa antioxidante que las placas de ateroma no calcificadas y heterogéneas. Los pacientes con sintomatología neurológica presentaron placas de ateroma con menor capacidad y defensas antioxidantes que los pacientes asintomáticos neurológicos.

Palabras clave: Estrés oxidativo. Carótida. Ictus. Aterosclerosis.

ABSTRACT

Introduction and objective: oxidative Stress (OS) has demonstrated a clear influence on atheroma plaque development due to the damage it causes to vascular endothelium. The aim of this study is to conduct research on key oxidative stress markers in patients with carotid artery atherosclerotic disease as a sign of vulnerability, analyze the implications of the redox status and mitochondrial metabolic state in carotid artery atherosclerotic pathology, and its relationship with neurological clinical presentation.

Patients and methods: atherosclerotic plaques obtained from carotid endarterectomy patients (both asymptomatic and symptomatic) at the Department of Angiology and Vascular Surgery of Hospital Clínico Universitario de Valladolid in 2020 will be examined. Clinical-demographic variables and the presence of neurological symptoms will be recorded. Anatomical and hemodynamic characteristics will be studied using Doppler ultrasound and computed tomography angiography (CTA) preoperatively. Atheroma plaques will be analyzed as estimators of lipid peroxidation degree reflecting the redox state. A sample size of 45 samples in each group has been estimated with a 5 % follow-up loss rate. Differences between groups will be studied using chi-square and T-

student tests to determine the relationship between redox potential and morphological characteristics of the atheroma plaque. SPSS 27.0 statistical software will be used, with a significance level set at $p < 0.05$.

Results: calcified atheroma plaques showed higher antioxidant capacity compared to non-calcified plaques in the ABTS parameter (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiozoline-6-sulfonic)) (2635.08 vs. 2803.28), with statistically significant relationship ($p = 0.007$). They also exhibited greater antioxidant defense when analyzing catalase activity (160.73 vs. 175.13) and SOD activity (1.11 vs. 1.49) ($p = 0.049$). In the study of the energy metabolism of carotid atheroma plaques, it was observed that lactate levels were higher in non-calcified plaques (11.45 vs. 8.57) ($p = 0.001$). Plasma levels of uric acid (1.48 vs. 2.33) and catalase activity (146.79 vs. 176.81) were significantly higher in patients with neurological symptoms ($p = 0.001$ and 0.025, respectively).

Conclusions: homogeneous and calcified carotid artery atheroma plaques exhibit higher antioxidant capacity and defense compared to non-calcified and heterogeneous plaques. Patients with neurological symptoms presented atheroma plaques with lower antioxidant capacity and defenses compared to asymptomatic neurological patients.

Keywords: Oxidative stress. Carotid. Stroke. Atherosclerosis.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se consideran el problema de salud más grave del mundo occidental, ya que son responsables de una de cada tres muertes en los países desarrollados (1), por lo que existe un interés global en su estudio con el objetivo de poder frenar esta incidencia.

Se sabe que la principal causa de las ECV es la aterosclerosis (de hecho, constituye la principal causa de mortalidad a nivel mundial) y

también que las personas que la sufren presentan una menor calidad de vida (1,2).

Una consecuencia directa de la enfermedad aterosclerótica es el desarrollo de un ictus, que supone la segunda causa de muerte en España (la primera en mujeres), la primera causa de discapacidad adquirida en el adulto y la segunda causa de demencia (3). Cada año 110 000-120 000 personas sufren un ictus en nuestro país, de las que el 50 % presenta secuelas discapacitantes o fallece (3).

La correcta categorización etiopatogénica del ictus isquémico es fundamental para seleccionar el tratamiento preventivo más adecuado y, con ello, disminuir el riesgo de recurrencias (4). De todas las causas, la más frecuente es la aterosclerótica con origen en las arterias carótidas o intracraneales.

Los factores de riesgo asociados a la aterosclerosis son la edad, el sexo, el tabaquismo, la dieta aterogénica, el sedentarismo, la hipertensión arterial, la diabetes *mellitus* de tipo 2 y dislipidemia (5).

Las dislipidemias cursan con un valor disminuido de colesterol HDL (*High Density Lipoprotein*) y un valor aumentado de triglicéridos y de colesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*), que se acumulan en la capa íntima de la arteria. Estos acúmulos promueven una activación de las células endoteliales inducida no solo por las LDL, sino también por citocinas proinflamatorias y cambios hemodinámicos (6).

En los últimos años se ha descrito cómo las moléculas LDL modificadas estructuralmente tras la acción oxidante de los radicales libres, especialmente la peroxidación lipídica, incrementan marcadamente sus características aterogénicas. Estas moléculas reciben el nombre de LDL oxidadas (LDL-ox) (6).

Es importante tener en cuenta que la evolución natural de lesiones ateroscleróticas con el mismo grado de estenosis es completamente diferente en los pacientes sintomáticos que en los asintomáticos. El riesgo de recurrencia clínica es superior al 13 % en los primeros y tan solo del 1-2 % en los segundos (7). Otras veces, placas moderadamente estenóticas evolucionan rápidamente y causan

alteraciones cerebrovasculares graves, mientras que estenosis importantes permanecen asintomáticas. Esto sugiere que no existe una correspondencia entre las características morfológicas de la placa y la biología celular implicada, lo que indica dos tipos de enfermedad carotídea: una forma estable, con poca probabilidad de producir embolización sintomática u oclusión (ictus), y otra inestable (no necesariamente más estenótica), con un alto riesgo de producir síntomas.

Por lo tanto, es importante conocer la morfología de la placa de ateroma en la arteria carótida, pero también los factores que influyen en su progresión y, por ende, en sus manifestaciones clínicas. En esta línea, la implicación del estrés oxidativo (EO) ha demostrado una clara influencia en el desarrollo de las placas de ateroma por los daños provocados en el endotelio vascular.

El objetivo de este trabajo es realizar un estudio de los principales marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedad aterosclerótica de la arteria carótida como signo de vulnerabilidad, analizar la implicación de la situación redox y el estado metabólico mitocondrial en la patología aterosclerótica de la arteria carótida y su relación con la clínica neurológica. Esto supondrá tener unos parámetros biológicos que nos identifiquen pacientes en riesgo de desarrollar un ictus, lo que supone una herramienta pronóstica altamente interesante que nos permitirá instaurar un tratamiento adecuado para evitar un ictus futuro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio y diseño

Se trata de un estudio coordinado con un protocolo único realizado en el Servicio de Angiología, Cirugía Vascular y Endovascular y en el Servicio Científico Técnico de Cultivos Celulares del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y en el Instituto de Ciencias de la Salud de Castilla y León.

Diseño: estudio prospectivo, longitudinal, observacional y comparativo con dos brazos: grupo de estenosis sintomática y grupo de estenosis asintomática, cuyas características se detallan a continuación.

Población de estudio

Criterios de inclusión: pacientes intervenidos de endarectomía carotídea asintomáticos y sintomáticos en el Servicio de Angiología, Cirugía Vascular y Endovascular del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV) con indicación quirúrgica según criterios del estudio NASCET durante el año 2020. En el estudio podrán distinguirse dos grupos: 1. Pacientes con estenosis carotídea asintomática, y 2. Pacientes con estenosis carotídea sintomática. El diagnóstico de estenosis carotídea se realizó mediante eco Doppler de troncos supraaórticos y angiografía por tomografía computarizada (CTA) y las medidas se analizaron según criterios del estudio NASCET (Fig. 1).

Criterios de exclusión: se tendrá en cuenta la existencia de antecedentes de enfermedad crónica (hepática, renal, endocrinometabólica, inmunológica, del sistema nervioso central, osteomuscular y cáncer), mujeres en estado de gestación y uso y abuso de drogas o de alcohol, así como la participación en otro ensayo clínico o tratamiento con algún fármaco en fase experimental. Además, serán excluidos aquellos individuos que consumieran algún suplemento o vitamina antioxidante.

Cálculo del tamaño muestral: aceptando un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste bilateral, se precisaron 45 sujetos en cada grupo para un margen de error del 5 %. Se asumió que la desviación estándar común es de 0,5. Se estimó una tasa de pérdidas de seguimiento del 5 %.

Variables de estudio

Variables clínicas y demográficas

Edad, sexo, factores de riesgo cardiovascular (diabetes *mellitus*, tabaquismo, dislipemia e hipertensión arterial), comorbilidad asociada, medicación crónica, índice de masa corporal y la asociación de sintomatología neurológica o de lesiones cerebrales signomáticas en la tomografía axial computarizada.

Variables analíticas en placa de ateroma

Se realizó un estudio de la capacidad antioxidante mediante el análisis de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), ABTS (2,2-ácino-bis[ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) y la determinación de ácido úrico, un estudio de las defensas antioxidantes mediante la determinación de la actividad de la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD), un estudio del daño oxidativo mediante el análisis de daño del ADN (8-oxodesoxiguanosina) y la peroxidación lipídica y un análisis de los probables problemas en el metabolismo energético mediante la determinación de los niveles plasmáticos de ácido láctico.

Variables morfológicas y hemodinámicas de la estenosis carotídea

Se llevó a cabo un estudio ecográfico y una CTA para determinar las características anatómicas y hemodinámicas de la placa de ateroma en el preoperatorio.

Estudio morfológico de la placa carotídea con eco Doppler y CTA: en el preoperatorio se realizó un estudio eco Doppler y una CTA de las arterias carótidas. Las placas de ateroma se caracterizaron siguiendo las recomendaciones del Capítulo de Diagnóstico Vascular no Invasivo de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular y se registraron las características morfológicas de las placas de ateroma identificadas en la CTA de los troncos supraaórticos. Se utilizó un eco Doppler Philips EPIQ CVx y todas las exploraciones se realizaron por un solo técnico para eliminar el sesgo de la variabilidad del explorador.

Se definió como una placa homogénea cuando mostraron las siguientes características ecográficas:

1. Ecogenicidad uniforme. La placa de ateroma homogénea tiende a mostrar una ecogenicidad uniforme en la ecografía, lo que significa que refleja las ondas de ultrasonido de manera consistente a lo largo de su superficie. Esto se debe a que la composición de la placa, que generalmente incluye depósitos de lípidos y calcio, es relativamente uniforme en toda su extensión.
2. Superficie lisa. La superficie de la placa de ateroma homogénea suele ser lisa en la ecografía, sin irregularidades evidentes o áreas con características diferentes en términos de textura o ecogenicidad.
3. Ausencia de sombra acústica posterior. En una placa homogénea es menos probable que se observe una sombra acústica posterior importante en la ecografía. La sombra acústica posterior se produce cuando los ultrasonidos no pueden atravesar eficazmente una estructura densa, como un depósito de calcio en una placa de ateroma.
4. Grosor medible del complejo íntima-media. La ecografía de una placa de ateroma homogénea puede permitir la medición del grosor del complejo íntima-media de la arteria carótida adyacente, lo que puede ser un indicador importante de la salud vascular.

Se definió como una placa heterogénea cuando mostraron las siguientes características ecográficas:

1. Ecogenicidad variada. Una placa de ateroma heterogénea muestra variaciones en su ecogenicidad en la ecografía. Esto significa que refleja las ondas de ultrasonido de manera desigual en diferentes áreas de la placa. Estas variaciones pueden ser el resultado de diferentes componentes, como depósitos de lípidos, calcio, coágulos sanguíneos o áreas de hemorragia dentro de la placa.

2. Superficie irregular. La superficie de una placa de ateroma heterogénea tiende a ser irregular en la ecografía, con áreas de textura diferente, protuberancias o depresiones. Esto puede indicar la presencia de ulceraciones o de erosiones en la superficie de la placa.
3. Sombra acústica posterior. En una placa heterogénea, es más probable que se observe una sombra acústica posterior en la ecografía. La sombra acústica posterior se produce cuando los ultrasonidos no pueden atravesar eficazmente estructuras densas, como depósitos de calcio o coágulos sanguíneos en una placa de ateroma.
4. Presencia de flujo turbulento. En algunos casos, una placa heterogénea de ateroma puede estar asociada con la presencia de flujo sanguíneo turbulento en la arteria carótida, lo que puede detectarse mediante el uso de la ecografía Doppler.

Estudio hemodinámico de la placa carotídea con eco Doppler. Para este propósito, se midió la velocidad del flujo en el punto de máxima estenosis y se evaluaron los cambios hemodinámicos en regiones proximales (arteria carótida común) y distales (carótida interna posestenótica). Esto permitió una cuantificación precisa de la estenosis carotídea. Los criterios utilizados para determinar el grado de estenosis carotídea se describen en la tabla I.

Tabla I. Criterios hemodinámicos para establecer el grado de estenosis carotídea, según la Guías básica diagnóstico de TSA del Capítulo Diagnóstico Vascular de la Sociedad española de Angiología y Cirugía Vascular.

CRITERIOS	GRADO DE ESTENOSIS ARTERIAL					
	<50%	50-69%	70-79%	80-89%	≥90%	Oclusión
SIGNOS DIRECTOS						
VSM	<125	125-230	>230	>300	Variable	NA
VDF	<40	40-100	>100	Variable	Variable	NA
SIGNOS INDIRECTOS						
VSM POSTESTENOSIS EN ACI	Normal	Normal	≥50	<50	<30	NA
FLUJO COLATERAL EN AO	No	No	No/↓/invertido	↓/invertido	↓/invertido	↓/invertido
FLUJO COLATERAL EN PW	No	No	No/presente	Presente	Presente	Presente
ÍNDICES						
RELACIÓN ENTRE VSM _{ACI} /VSM _{ACC}	<2	≥2	>4	>4	Variable	NA

ACC: arteria carótida común; ACI: arteria carótida interna; AO: arteria oftálmica; NA: no aplicable; PW: polígono de Willis; VDF: velocidad diastólica final; VSM: velocidad sistólica máxima.

METODOLOGÍA

Obtención de muestras

Las muestras de la placa de ateroma se obtuvieron después de llevar a cabo la endarterectomía carotídea. Durante la cirugía, se extrajo la placa de ateroma junto con la capa íntima de la arteria carótida y la mitad interna de la capa media. Luego, se conservaron en nitrógeno líquido a una temperatura de -195,8 °C hasta el momento de su análisis.

Estudio de la capacidad antioxidante

Con el fin de aumentar tanto la sensibilidad como la especificidad de los resultados analizamos la capacidad antioxidante del plasma mediante tres enfoques diferentes:

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Este ensayo se basa en la capacidad de la muestra para permitir la reducción de hierro, que se lleva a cabo como se describe por Benzie y Strain. Los resultados se

cuantifican mediante absorbancia a 595 nm utilizando una curva estándar de concentraciones conocidas de Trolox (8).

ABTS (2,2-ácido-bis[ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]). Esta técnica se basa en la estimación de la capacidad antioxidante por una prueba colorimétrica mediante el radical catiónico (ABTS+), basado en el método de Re y cols. (9).

Ácido úrico. El ácido úrico es oxidado por la uricasa, la alantoína y el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, en presencia de la peroxidasa, reacciona con el DHBS y con 4-aminoantipirina, que forman el cromógeno anti pirroloquinolina quinona. La intensidad del color rojo formado es directamente proporcional a la concentración de ácido en la muestra.

Estudio de las defensas antioxidantes

Actividad de la catalasa

La catalasa es una enzima perteneciente a la categoría de las oxidoreductasas, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Esta enzima utiliza como cofactor al grupo hemo y manganeso. Se determinó la actividad enzimática de la catalasa titulando con permanganato de potasio el peróxido de hidrogeno remanente.

Actividad superóxido dismutasa (SOD)

El método de detección de la actividad de la SOD se realiza con base en la cuantificación de la reducción de WST-1, que produce un colorante formazán soluble en agua.

Estudio del daño oxidativo

Daño al ADN [8-oxodesoxiguanosina]

La 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina es un importante derivado oxidado espontáneo de la 2'-desoxiguanosina y un biomarcador del daño oxidativo del ADN. Se forma mediante la reacción de la guanina con especies reactivas del oxígeno. Aunque normalmente se repara y se

elimina mediante el mecanismo de reparación por escisión de bases, la 8-oxo-dG puede dañarse potencialmente con la desoxiadenina, lo que da lugar a mutaciones de G a T, que causan recombinaciones frecuentes y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el genoma humano. La concentración de 8-oxo-dG en una célula es una medida del estrés oxidativo y, por lo tanto, puede utilizarse para evaluar el grado de daño fisiológico y ambiental del ADN.

Peroxidación lipídica [MDA] [HNE]. Para cuantificar su concentración, se homogeneizó la muestra mediante la adición de tampón Tris 20 mM y se sometió a centrifugación. Se preparó una solución de la muestra junto con el indol, se centrifugó nuevamente y se tomaron alícuotas para, finalmente, medir la absorbancia.

3.4. Aspectos éticos y legales de la investigación

El estudio clínico fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. En lo que respecta a la anonimización de las muestras, se procedió a mantener la confidencialidad de los datos personales y clínicos, respetando en todo momento los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas, así como lo establecido por la legislación aplicable (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos, Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente y Sanitaria y Ley 14/1986, General de Sanidad).

3.5. Análisis estadístico

Las variables nominales se expresaron en porcentaje, mientras que las variables cuantitativas se presentaron mediante la media y su desviación estándar.

Se verificaron los supuestos de normalidad para las variables cuantitativas mediante la prueba de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov con la corrección de significación de Lilliefors. La asociación entre las variables categóricas (características morfológicas de la placa y sintomatología neurológica) se examinó a través de la prueba

de χ^2 y la relación entre la media de las variables cuantitativas en dos grupos de variables categóricas (características morfológicas de la placa y sintomatología neurológica) se analizó mediante la prueba t de Student.

Se empleó el programa estadístico SPSS 27.0 (www.spss.com), considerando un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Se recolectaron 96 placas carotídeas de ateroma de pacientes que se sometieron a endarterectomía carotídea (tanto asintomáticos como sintomáticos) en el Servicio de Angiología, Cirugía Vascular y Endovascular del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV) durante el año 2020. Las características de los pacientes quedan reflejadas en la tabla II.

Tabla II. Características clínicas de los pacientes del estudio

Características	Grupo de pacientes asintomáticos	Grupo de pacientes sintomáticos	p
Número de pacientes	45	45	
Edad (años) (media \pm sd)	75,4 \pm 1,48	77,3 \pm 1,87	0,79
Varones (%)	73	75	0,64
Diabetes <i>mellitus</i> (%)	45	41	0,78
Tabaquismo (%)	72	78	0,62
Dislipemia (%)	56	61	0,53
Hipertensión arterial (%)	43	48	0,58
Comorbilidad (%)	34	38	0,43
Tratamiento con estatinas (%)	56	65	0,087
Índice de masa corporal (media \pm sd)	26,3 \pm 1,52	28,2 \pm 1,38	0,71
Placas calcificadas de ateroma (%)	40	60	0,68
Placas no calcificadas de ateroma (%)	25	75	
Niveles de lactato en placas de ateroma (media \pm sd)	9,70 \pm 4,51	9,74 \pm 3,77	0,98

Niveles plasmáticos de ácido úrico (media \pm sd)	1,48 \pm 0,77	2,33 \pm 1,38	0,098
---	-----------------	-----------------	-------

sd: desviación estándar.

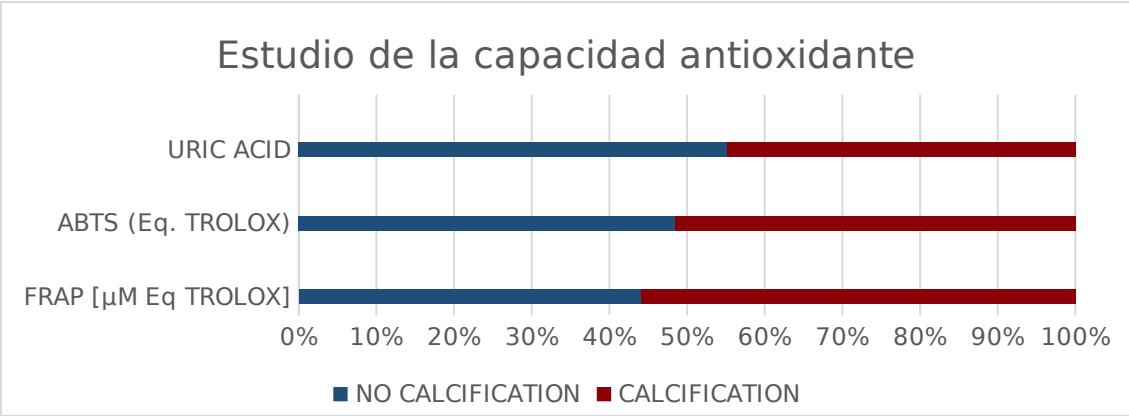
El porcentaje de estenosis media de las placas de ateroma carotídeas calcificadas fue de $75,8 \pm 14,81$ en comparación con las placas no calcificadas, que presentaron un porcentaje de estenosis media de $71,58 \pm 10,80$ ($p = 0,143$). De estas, el 75 % de las placas no calcificadas y el 60 % de las placas calcificadas fueron sintomáticas ($p = 0,235$) (Fig. 2).

Se realizaron pruebas de normalidad para las variables cuantitativas, incluyendo FRAP, ABTS, ácido úrico, actividad de la catalasa, actividad SOD, daño del ADN y peroxidación lipídica. Todas estas variables mostraron una distribución gaussiana.

Las placas calcificadas de ateroma exhibieron una mayor capacidad antioxidante en comparación con las placas no calcificadas en el parámetro ABTS (2,2-ácido-bis[ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) (2635,08 frente a 2803,28), con una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,007$) (Tabla III).

Tabla III. Estudio de la capacidad antioxidante en las placas de ateroma carotídea según sus características morfológicas

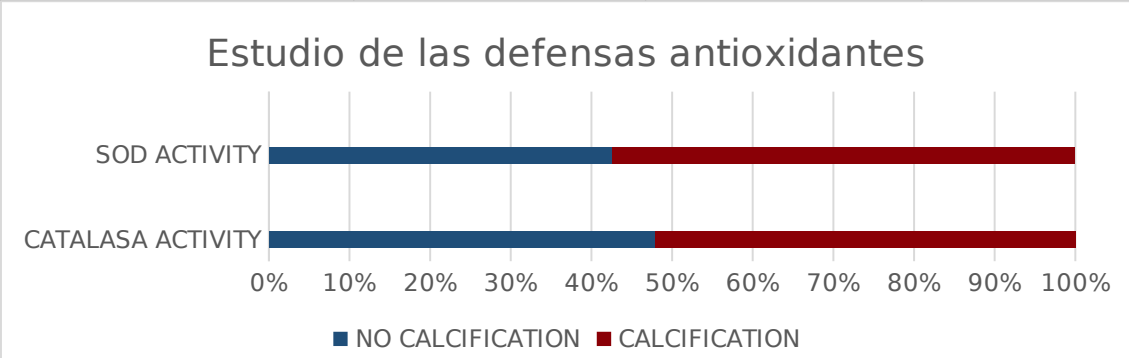
Estudio de la capacidad antioxidante	Sin calcificación	Calcificación	<i>p</i>
FRAP [μ M Eq TROLOX]	142,92 \pm 73,71	181,62 \pm 115,68	0,285
ABTS (Eq. TROLOX)	2635,08 \pm 323,80	2803,28 \pm 223,27	<i>0,007</i>
Ácido úrico	2,22 \pm 1,40	1,81 \pm 0,95	0,135



Cuando se estudiaron las defensas antioxidantes de las placas de ateroma, las placas no calcificadas mostraron una menor defensa antioxidante, tanto en la actividad catalasa (160,73 frente a 175,13) como en la actividad SOD (1,11 frente a 1,49). La diferencia fue estadísticamente significativa en este último caso ($p = 0,049$) (Tabla IV).

Tabla IV. Estudio de las defensas antioxidantes en las placas de ateroma carotídea según sus características morfológicas

Estudio de las defensas antioxidantes	Sin calcificación	Calcificación	<i>p</i>
Actividad de la catalasa	160,73 ± 44,97	175,13 ± 102,79	0,402
Superóxido dismutasa	1,11 ± 0,53	1,49 ± 1,20	0,049

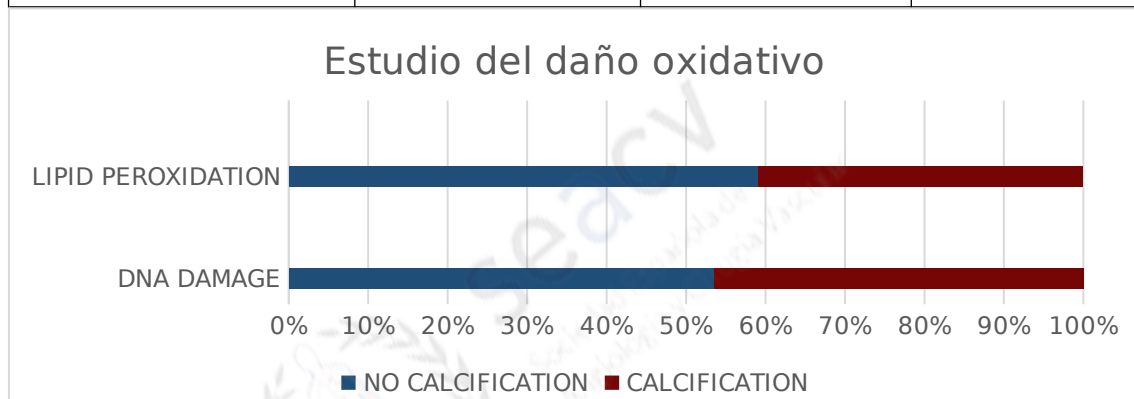


Posteriormente, se analizó el daño oxidativo, que resultó ser superior en las placas de ateroma no calcificadas, tanto en el daño del ADN (3318,96 frente a 2887,15) como en la peroxidación lipídica (46,87

frente a 32,45). Sin embargo, estas diferencias no alcanzaron significación estadística ($p = 0,33$ y $0,12$, respectivamente) (Tabla V).

Tabla V. Estudio del daño oxidativo en las placas de ateroma carotídea según sus características morfológicas

Estudio del daño oxidativo	Sin calcificación	Calcificación	<i>p</i>
Daño del ADN	3318,96 ± 1919,83	2887,15 ± 2052,13	0,336
Peroxidación lipídica	46,87 ± 30,81	32,45 ± 16,88	0,120



Se procedió a investigar la relación entre estos parámetros de capacidad antioxidante, defensa antioxidante y el daño del ADN con la sintomatología neurológica de los pacientes. Se encontró que los niveles plasmáticos de ácido úrico (1,48 frente a 2,33) y la actividad de la catalasa (146,79 frente a 176,81) fueron significativamente más elevados en los pacientes con sintomatología neurológica ($p = 0,001$ y $0,025$, respectivamente). En contraste, los niveles de actividad SOD (1,77 frente a 1,10) y del daño del ADN (4393,01 frente a 2476,91) fueron más altos en pacientes sin sintomatología neurológica concomitante ($p = 0,009$ y $0,002$, respectivamente) (Tablas VI, VII y VIII).

Tabla VI. Estudio de la capacidad antioxidante en las placas de ateroma carotídea y la asociación con la sintomatología neurológica

Estudio de la	Sin síntomas	Neurológicos	<i>p</i>
---------------	--------------	--------------	----------

capacidad antioxidante	neurológicos		
FRAP [μM Eq TROLOX]	$185,98 \pm 110,31$	$159,11 \pm 85,90$	0,43
ABTS (Eq. TROLOX)	$2777,18 \pm 285,00$	$2698 \pm 278,32$	0,22
Ácido úrico	$1,48 \pm 0,74$	$2,33 \pm 1,36$	0,001

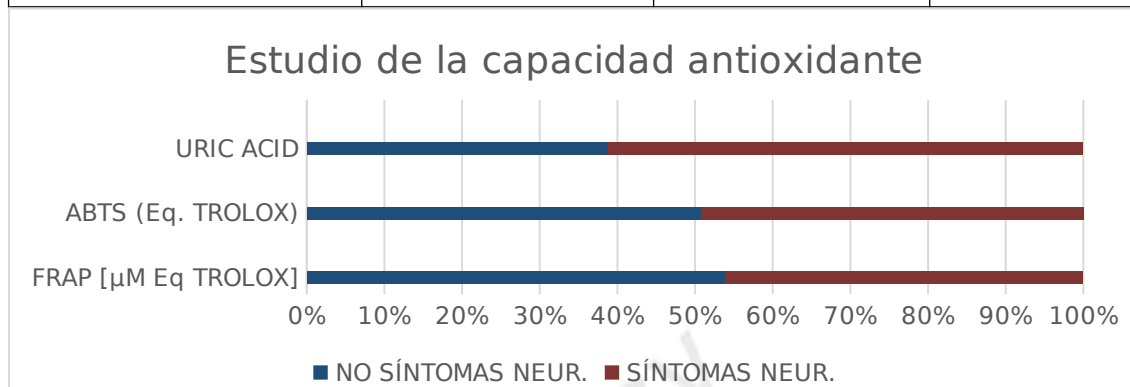


Tabla VII. Estudio de las defensas antioxidantes en las placas de ateroma carotídea y la asociación con la sintomatología neurológica

Estudio de las defensas antioxidantes	Sin síntomas neurológicos	Síntomas neurológicos	<i>p</i>
Actividad de la catalasa	$146,79 \pm 28,97$	$176,81 \pm 92,38$	0,025
Actividad SOD	$1,77 \pm 1,15$	$1,10 \pm 0,79$	0,009

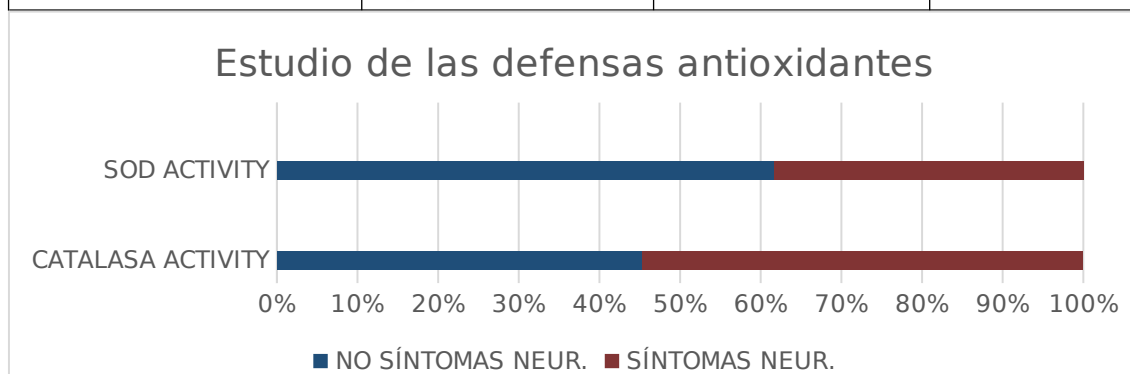
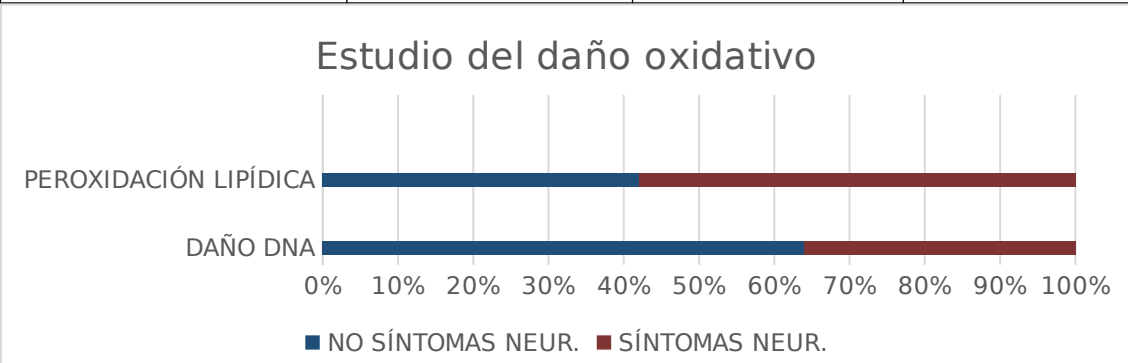


Tabla VIII. Estudio del daño oxidativo en las placas de ateroma carotídea y la asociación con la sintomatología neurológica

Estudio del daño oxidativo	Sin síntomas neurológicos	Síntomas neurológicos	<i>P</i>
Daño del ADN	$4393,01 \pm 2817,94$	$2476,91 \pm 1007,22$	0,002

Peroxidación Lipídica	32,20 ± 17,04	44,44 ± 28,40	0,12
-----------------------	---------------	---------------	------



DISCUSIÓN

En nuestro estudio se demuestra la relación entre el estrés oxidativo y la vulnerabilidad de la placa de ateroma de la carótida. Observamos que las placas calcificadas de ateroma presentaron mayor capacidad antioxidante, mayores defensas antioxidantes, menor daño oxidativo y menores alteraciones del metabolismo energético. Los resultados de estudio explican por qué las placas de ateroma no calcificadas son altamente vulnerables, con mayor probabilidad de desarrollar complicaciones neurológicas. Por otra parte, los pacientes con sintomatología neurológica presentaron mayor actividad de marcadores de estrés oxidativo en las placas analizadas de ateroma. El estudio destaca que las placas de ateroma calcificadas mostraron una mayor capacidad y defensa antioxidantes en comparación con las placas no calcificadas. Estos hallazgos sugieren que las diferencias en la respuesta al estrés oxidativo pueden estar relacionadas con la naturaleza de las placas ateroscleróticas en lugar de con otros factores como la edad, el género, factores de riesgo cardiovasculares o el tratamiento previo de los pacientes, puesto que estos factores tuvieron una distribución homogénea en ambos grupos del estudio. Este es el motivo por el que nuestro estudio nos permite conocer el estado de estrés oxidativo subyacente en la placa carotídea, aportando una información completa del riesgo de ictus de un paciente con una estenosis carotídea, con independencia de su grado

de estenosis. Es el primer estudio en el que se evidencia una relación entre la implicación del EO en el desarrollo de ictus en pacientes ateroscleróticos.

Es conocido que el riesgo de ictus es mayor las placas de ateroma hipoecoicas y heterogéneas, según se ha demostrado en el Cardiovascular Health Study (10), Gronholdt y cols. (11), Sterpetti y cols. (12) y Abu-Rahma y cols. (13). Sin embargo, el estudio ecográfico tiene una limitación metodológica, que es su valoración subjetiva. En este sentido, y para evitar este sesgo, se han realizado mediciones informáticas de la escala de grises en la imagen en modo B (GSM) de las placas de ateroma. Esta medición ha demostrado ser un importante factor discriminatorio entre las lesiones ecolúcidas y ecogénicas, aunque no se ha relacionado con el grado de vulnerabilidad de la placa, lo cual es uno de los objetivos de nuestro estudio.

El estrés oxidativo (EO) ha demostrado una clara influencia en el desarrollo de las placas de ateroma por los daños provocados en el endotelio vascular (14). En el ser humano, el EO participa en los mecanismos etiopatogénicos primarios, o en sus consecuencias, en más de 100 enfermedades de gran importancia clínica y social, como la aterosclerosis y el proceso de envejecimiento.

Como consecuencia del metabolismo propio para la obtención de energía en forma de ATP, las células producen ROS (*reactive oxygen species*). Estas moléculas tienen una vida media corta, pero son altamente reactivas. Las ROS se producen principalmente en la mitocondria como consecuencia del metabolismo del oxígeno y, cuando se produce un desequilibrio entre su producción y la capacidad antioxidante del sistema, se genera un ambiente oxidativo, lo que provoca el denominado EO (15). Los niveles elevados de EO agotan el ATP de la célula y, como consecuencia, se produce la muerte celular, que libera al medio numerosos compuestos citotóxicos, ya que se impide la muerte celular por apoptosis controlada.

La mitocondria es el principal lugar de generación de ROS. El primero que se genera es el ion superóxido, que se produce principalmente por la fuga de electrones que tiene lugar en los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico (16). A pesar de que la conversión de superóxido a peróxido de hidrógeno es rápida, gracias a la acción de la enzima superóxido dismutasa, se trata de una ROS muy reactiva, ya que en cuestión de microsegundos puede reaccionar con proteínas, ADN y lípidos, lo que causa efectos perjudiciales para las células, o con otros elementos, lo que crea y propaga nuevos ROS (16).

Al EO se le considera vinculado a las ECV, ya que produce oxidación de LDL, que lesionan el endotelio vascular, a partir del cual se inicia la formación de la placa de ateroma (17). Además de la disfunción endotelial, el EO está relacionado con la reducción de la biodisponibilidad del óxido nítrico, con el aumento de las propiedades anticoagulantes, el aumento de la agregación plaquetaria y el aumento de la expresión de moléculas de adhesión, de quimiocinas y de citoquinas, todos ellos fenómenos inflamatorios y protrombóticos que influyen en la progresión de la aterosclerosis (18).

A pesar de los progresos en el estudio del EO sobre la lesión arterial, todavía queda mucho por investigar. Es necesaria una mejor comprensión de los mecanismos reguladores de la activación de la oxidasa en la pared arterial y de la interferencia entre los diferentes orígenes de ROS, así como de sus consecuencias. Autores como Rafiei A y cols. estudiaron la concentración sérica de FRAP en pacientes con enfermedad coronaria. Sus resultados confirmaron que el aumento del estrés oxidativo se correlacionaba con el aumento de la estenosis arterial y observaron que los niveles séricos de FRAP disminuyeron en el grupo con enfermedad coronaria en comparación con el grupo de control (19). Feki A y cols. estudiaron la cardiotoxicidad y el daño del ADN asociados al infarto de miocardio inducido por tiametoxam *in vitro* e *in vivo*. Los autores analizaron el potencial antioxidante mediante la actividad captadora de radicales ABTS, las pruebas de

oxidación del ácido linoleico y el ensayo de mellado del genoma y del ADN cardíacos (20).

Nuestro estudio presenta limitaciones, ya que incluye pacientes con un estadio avanzado de estenosis carotídea, precisamente porque son los pacientes que acuden a nuestro servicio y necesitan un tratamiento quirúrgico, por lo que no podemos estudiar aquel segmento poblacional con placas de ateroma moderadas no susceptibles de tratamiento quirúrgico, según las directrices internacionales actuales. Para ello se ha tenido en cuenta la naturaleza multifactorial del estrés oxidativo y, por tanto, se han estudiado diversos sistemas de producción de ROS y de defensa antioxidante. Por otra parte, no se ha planteado en el estudio la realización de una evaluación exhaustiva de todos los parámetros de estrés oxidativo, sino solo de aquellos relevantes y cuya medida pueda abordarse sistemáticamente sin demasiada dificultad técnica en un laboratorio de análisis clínicos y que permitan abrir importantes perspectivas futuras de diagnóstico, como la detección precoz de la enfermedad carotídea inestable en grupos de riesgo, incluso antes de la aparición de síntomas clínicos, mediante la evaluación de su nivel global de estrés oxidativo específico. Una limitación de este estudio es la falta de mediciones objetivas del grosor del complejo fibroateromatoso (GSM), que permite caracterizar la composición de las placas de ateroma, ya que este estudio pudo realizarse mediante el análisis histoquímico, que es más preciso. Por otra parte, la valoración de las características morfológicas de las placas de ateroma fue subjetiva, lo que podría haber introducido un sesgo en los resultados. Para controlar este hecho, las valoraciones se realizaron por un único técnico con experiencia en el estudio eco Doppler de troncos supraaórticos.

Por lo tanto, aunque es importante conocer la morfología de la placa de ateroma en la arteria carótida, también lo es conocer los factores que influyen en su progresión y, por ende, en sus manifestaciones clínicas. Por ello, la determinación de mediadores de la inflamación

proporciona un campo de investigación novedoso. Estos estudios pueden ser importantes no solo por la identificación de marcadores pronósticos de la inestabilidad de la placa, sino también como controles séricos de nuevas estrategias terapéuticas con las que tratar la enfermedad aterosclerótica.

El desarrollo de nuevas dianas moleculares y agentes farmacológicos que puedan bloquear los efectos negativos de las ROS patológicas también mejorará en gran medida el campo de conocimiento en la investigación cardiovascular. Es importante comprometerse en el avance del conocimiento de la biología del EO y de la enfermedad aterosclerótica para conseguir identificar dianas terapéuticas más eficaces en la ECV.

Es de gran utilidad para la práctica clínica habitual contar con una batería de biomarcadores que permitan caracterizar el ambiente redox sistémico en pacientes que padecen de enfermedades asociadas a la aterosclerosis. Estas determinaciones bioquímicas permitirán individualizar la terapia de cada paciente y contribuir a reducir los daños oxidativos que tienen lugar durante el desarrollo y el progreso aterogénico.

CONCLUSIONES

Las placas de ateroma homogéneas y calcificadas de la arteria carótida presentan mayor capacidad y defensa antioxidante que las placas de ateroma no calcificadas y heterogéneas. Los pacientes con sintomatología neurológica presentaron placas de ateroma con menor capacidad y defensas antioxidantes que los pacientes asintomáticos neurológicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lloyd Jones D, Adams R, Carnethon M, de Simone G, Ferguson TB, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics-2009 update: A report from the American Heart Association statistics

- committee and stroke statistics subcommittee. *Circulation* 2009;119:480-6. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191259
2. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95. DOI: 10.1152/physrev.00018.2001
 3. Brea A, Laclaustra M, Martorell E, Pedragosa A. Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en España. *Clínica e Investigación en Aterosclerosis* 2013;25(5):201-32. DOI: 10.1016/j.arteri.2013.10.006
 4. Gökçal E, Niftaliyev E, Asil T. Etiological classification of ischemic stroke in young patients: a comparative study of TOAST, CCS, and ASCO. *Acta Neurol Belg* 2017;117(3):643-8. DOI: 10.1007/s13760-017-0813-8
 5. Rai V, Agrawal DK. The role of damage- and pathogen-associated molecular patterns in inflammation-mediated vulnerability of atherosclerotic plaques. *Can J Physiol Pharmacol* 2017;95(10):1245-53. DOI: 10.1139/cjpp-2016-0664
 6. Markstad H, Edsfeldt A, Yao Mattison I, Bengtsson E, Singh P, Cavalera M, et al. High levels of soluble lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 are associated with carotid plaque inflammation and increased risk of ischemic stroke. *J Am Heart Assoc* 2019;8(4):e009874. DOI: 10.1161/JAHA.118.009874
 7. Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. *Stroke* 2000;31:774-81. DOI: 10.1161/01.STR.31.3.774
 8. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239(1):70-6. DOI: 10.1006/abio.1996.0292
 9. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26(9-10):1231-7. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
 10. Polak JF, Shemanski L, O'Leary D, Lefkowitz D, Price TR, Savage PJ, et al. Hypoechoic plaque at US of the

- carotid artery: an independent risk factor for incident stroke in adults aged 65 years or older. Cardiovascular Health Study. Radiology 1998;208:649-54. DOI: 10.1148/radiology.208.3.9722841
11. Gronholdt MLM, Nordestgaard BG, Schroeder TV, Vorstrup S, Sillesen H. Ultrasonic echolucent carotid plaques predict future strokes. Circulation 2001;104:68-73. DOI: 10.1161/hc2601.091704
 12. Sterpetti AV. Eversion endarterectomy of the internal carotid artery combined with open endarterectomy of the common carotid artery. Am J Surg 2010;200(3): e44-7. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2009.12.029
 13. Abu-Rahma AF, Wulu JT, Crotty B. Carotid plaque ultrasonic heterogeneity and severity of stenosis. Stroke 2002;33:1772-5. DOI: 10.1161/01.STR.0000019127.11189.B5
 14. Borné Y, Fagerberg B, Persson M, Östling G, Söderholm M, Hedblad B, et al. Cadmium, carotid atherosclerosis, and incidence of ischemic stroke. J Am Heart Assoc 2017;6(12). DOI: 10.1161/JAHA.117.006415
 15. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol 2003;552(2):335-44. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.049478
 16. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. Neuropharmacology 2001;40:959-75. DOI: 10.1016/S0028-3908(01)00019-3
 17. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovski S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patients. A call for new definitions and risk assessment strategies: part II. Circulation 2003;108:1772-8. DOI: 10.1161/01.CIR.0000087481.55887.C9

18. Summerhill V, Karagodin V, Grechko A, et al. Vasculoprotective Role of Olive Oil Compounds via Modulation of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med* 2018;5:188. DOI: 10.3389/fcvm.2018.00188
19. Rafiei A, Ferns GA, Ahmadi R, et al. Expression levels of miR-27a, miR-329, ABCA1, and ABCG1 genes in peripheral blood mononuclear cells and their correlation with serum levels of oxidative stress and hs-CRP in the patients with coronary artery disease. *IUBMB Life* 2021;73(1):223-37. DOI: 10.1002/iub.2421
20. Feki A, Ben Saad H, Bkhairia I, et al. Cardiotoxicity, and myocardial infarction-associated DNA damage induced by thiamethoxam in vitro and in vivo: Protective role of Trigonella foenum-graecum seed-derived polysaccharide. *Environ Toxicol* 2019;34(3):271-82. DOI: 10.1002/tox.22682

FIGURAS

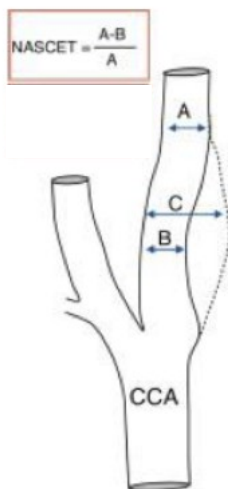


Figura 1. Metodología en la cuantificación de la estenosis carotídea según el estudio NASCET.

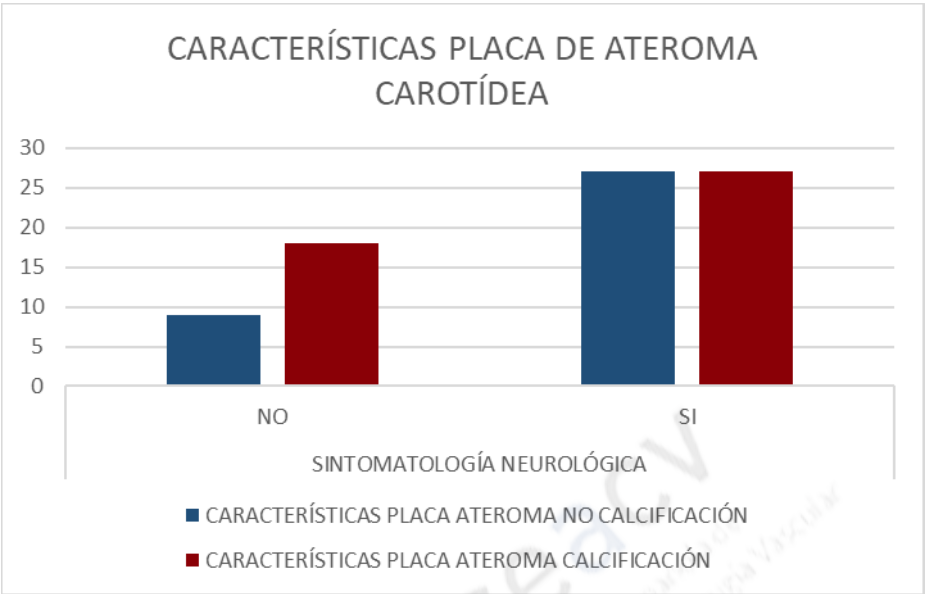


Figura 2. Características de la placa de ateroma carotídea con respecto a la sintomatología neurológica de los pacientes.