

ORIGINALES

Generación de radicales libres de oxígeno durante el clampaje aórtico prolongado

Oxygen free radical-mediated injury in reperfusion after prolonged aortic cross-clamping

M. Miralles* - J. M. Hidalgo** - M. I. Covas* - L. Gallart* - J. Cotillas* - A. Giménez* - A. Corominas* - M. A. Cairols*

Hospital Universitario del Mar
Universidad Autónoma de
Barcelona (España)

RESUMEN

Objetivos: Determinar si la preoxidación lipídica secundaria a la generación de radicales libres del oxígeno es un fenómeno apreciable durante la reperfusión tras clampajes prolongados de la aorta abdominal.

Pacientes y método: Nueve pacientes (7 resecciones de aneurisma aórtico, 1 tórax abdominal y 6 infrarrenales; y 2 injertos aortobifemorales asociados a revascularización renal) fueron seleccionados con los únicos criterios de inclusión de anastomosis aórtica término-terminal y tiempo de clampaje > 30 min. En todos ellos se determinaron los niveles plasmáticos de pO_2 , pCO_2 , pH, ácido láctico y malondialdehido (MDA) a nivel de la vena cava inferior, en los siguientes intervalos: basal, clampaje, y 5, 30 y 60 minutos tras el desclampaje.

Resultados: Se detectó una elevación significativa de pCO_2 y ácido láctico, así como una disminución del pH, durante el clampaje y a los 5 minutos del desclampaje. Los tres parámetros retornaron a los valores basales inmediatamente tras la reperfusión. Por el contrario, se registró un aumento significativo de los niveles plasmáticos de MDA diferida a los 60 minutos tras el desclampaje ($p<0.005$).

Conclusiones: Estos resultados sugieren que la activación significativa del metabolismo anaerobio y peroxidación

lipídica tienen lugar durante el clampaje aórtico y de forma diferida tras el desclampaje, respectivamente. La reperfusión tras períodos de clampaje aórtico superiores a 30 minutos puede constituir un modelo clínico adecuado del síndrome de reperfusión mediado por radicales libres del oxígeno.

Palabras clave: Radicales libres del oxígeno; clampaje aórtico prolongado.

SUMMARY

Purpose: The aim of this study was to determine whether significant lipid peroxidation secondary to oxygen free radicals generation occurs after prolonged aortic cross-clamping.

Patients and methods: Nine patients (7 aneurysm resections, 1 thoraco-abdominal and 6 infra-renal; and 2 aorto bifemoral grafts associated to renal artery revascularization) were selected according to the following criteria: cross-clamping time > 30 minutes, and aortic anastomosis performed in an end to end fashion. In all of them pO_2 , pCO_2 , pH, lactic acid and malondialdehyde (MDA) plasma levels in the inferior vena cava were monitored at the following intervals: baseline, clamping, and 5, 30 and 60 minutes after declamping.

Results: A significant increase in pCO_2 and lactic acid, and decrease in pH, were detected at clamping and 5 minutes after declamping. All three parameters returned to baseline levels in the early reperfusion period. In contrast, significantly increased MDA plasma levels were detected in the late reperfusion period at 60 minutes after declamping ($p<0.005$).

* Hospital Universitario del Mar.

** Departamento de Fisiología Animal.

Conclusions: These data suggest that a significant activation of anaerobic metabolic pathways and lipid peroxidation occur during aortic cross clamping and delayed after declamping, respectively. Reperfusion after aortic clamping periods greater than 30 minutes may be a useful clinical model of oxygen free radicals-mediated injury.

Key words: Free radicals; reperfusion injury; prolonged aortic cross-clamping.

Introducción

Durante los últimos años se ha despertado un creciente interés sobre la posible toxicidad del oxígeno y su papel en determinadas patologías. Este efecto, mediado a través de la peroxidación de las membranas celulares por los oxirradicales, se ha implicado en numerosos procesos metabólicos y degenerativos, constituyendo el punto de partida de nuevas teorías sobre el envejecimiento (1).

La generación de radicales libres del oxígeno y su posible bloqueo mediante substancias antioxidantes encuentra su paradigma a nivel clínico en la reperfusión de tejidos isquémicos. Su intervención ha sido ampliamente estudiada en infarto de miocardio (1), isquemia mesentérica (2), circulación extracorpórea (3), injertos cutáneos (4) y transplante de órganos (5, 6). No obstante, llama la atención el escaso número de publicaciones referentes a su análisis durante los procedimientos de revascularización de las extremidades.

El objetivo de este estudio consistió en determinar si los fenómenos de peroxidación lipídica, secundarios a la generación de radicales libres del oxígeno, tienen lugar de forma apreciable durante el desclamping en la cirugía aórtica y valorar su utilidad como modelo clínico de reperfusión para el ensayo, en un futuro próximo, de diversas substancias antioxidantes.

Pacientes y método

El diseño del estudio fue prospectivo y de medidas repetidas. Se incluyeron 9 pacientes por asignación sucesiva durante un periodo de 6 meses, con los

únicos criterios de inclusión: anastomosis aórtica término-terminal y tiempo de clampaje superior a 30 minutos.

Las técnicas quirúrgicas utilizadas fueron las siguientes: resección de aneurisma tóraco-abdominal con injerto aorto-aórtico en un paciente; 6 aneurismas infrarrenales fueron reparados mediante injerto aorto-aórtico en 3 casos, aortobifemoral en 2 y mixto, aortoilíaco y femoral, en otro; por último, en 2 casos de estenosis ilíaca bilateral con estenosis de la arteria renal, se practicó by-pass aorto-bifemoral y aortorenal izquierdo.

En todos los casos se realizó la inducción anestésica con tiopenthal (3 a 5 mg/kg), fentanyl (5 a 7 ug/kg) y vecuronio (0,1 mg/kg), manteniendo la misma con fentanyl (3-4 ug/kg/h), dosis fraccionadas de vecuronio e isofluorane al 0,5-1%. Durante la intervención se administró una mezcla de oxígeno y óxido nitroso al 50%, ajustando la ventilación para mantener la pCO₂ en rangos normales (35-40 mm Hg).

Los parámetros bioquímicos monitorizados fueron: pH, pCO₂ y ácido láctico, como marcadores de metabolismo anaerobio, y malondialdehido (MDA) como indicador de peroxidación lipídica. Se consideraron los siguientes intervalos: basal, al final del periodo de clampaje y a los 5, 30 y 60 minutos de iniciada la reperfusión. En cada uno de ellos se realizaron extracciones de sangre por punción de la vena cava inferior, excepto la última que se obtuvo a partir de un catéter femoral con su extremo situado en la confluencia de ambas ilíacas. Todas las muestras se obtuvieron por triplicado. La primera de ellas fue remitida inmediatamente al Laboratorio de Bioquímica para determinación de pH y pCO₂, mientras que las otras dos se mantuvieron refrigeradas con hielo hasta el final de la intervención. A continuación fueron centrifugadas a -4° C determinando, tras separar el plasma, los niveles de ácido láctico en la segunda muestra. La tercera fue conservada a -70° hasta el final del estudio, siendo analizadas conjuntamente para determinar las concentraciones de MDA. El método utilizado para este fin fue el test del ácido tiobarbitúrico (TBA), según la técnica descrita por Uchiyama y col. (7).

El análisis estadístico de los datos incluyó: estadísticos descriptivos (media y desviación típica) de cada uno de los parámetros en los respectivos períodos de

tiempo, y comparación entre los distintos intervalos mediante el análisis multivariado de la varianza (MANOVA; SPSS-PC+).

Resultados

Durante el periodo de clampaje y a los 5 minutos de la reperfusión los valores de pH eran significativamente más bajos que en el resto de las muestras ($p=0,03$ y $p<0,005$, respectivamente), alcanzando un mínimo de 7,12 en el caso del aneurisma tóraco-abdominal (Tabla I). Asimismo, los niveles de pCO_2 mostraron un ascenso significativo durante estos dos intervalos ($p=0,03$ y $p<0,005$, respectivamente), para normalizarse a partir de los 30 minutos (Tabla I). El ácido láctico registró, igualmente, una elevación significativa en relación con el clampaje ($p<0,005$) alcanzando un máximo de 10,5 nmol/l a los 5 minutos de la reperfusión, de nuevo en el caso con tiempo de isquemia más prolongado ($p<0,005$). Las concentraciones máximas de MDA presentaron una diferencia significativa con respecto a las restantes determinaciones ($p<0,005$) pero, a diferencia de los parámetros anteriores, ésta sólo se obtuvo en la última muestra (60 minutos) (Tabla I). La representación simultánea de las variaciones promedio registradas en los distintos parámetros aparece reflejada en la Figura 1.

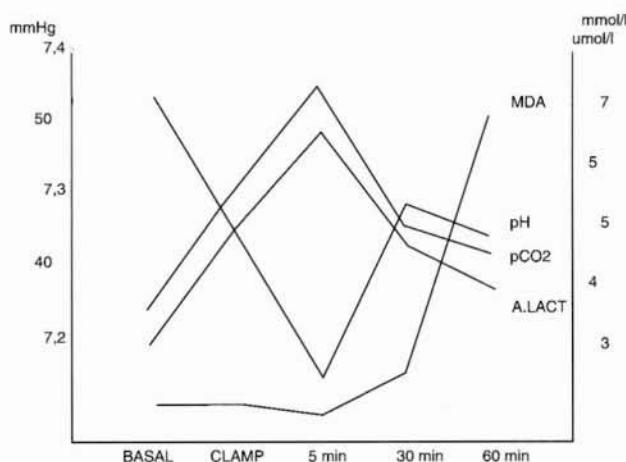


Fig. 1. Variación de los valores promedio de pH, pCO_2 , ácido láctico y malondialdehido (MDA), respecto a los valores basales, en los intervalos considerados

Discusión

El punto de partida que permite explicar la lesión tisular de reperfusión mediada por radicales libres del oxígeno se basa en la generación de anión superóxido (O_2^-) por la xantín-oxidasa (XO). Esta enzima se sintetiza bajo la forma de xantín-dehidrogenasa (forma D), constituyendo el 90% de su actividad en el tejido sano; cataliza el paso de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico, reduciendo el NAD a

Valores promedio + desviación típica de pH, pCO_2 , ácido láctico y malondialdehido (MDA), a nivel de vena cava inferior, en los distintos intervalos considerados

| | BASAL | CLAMP | 5 min. | 30 min. | 45 min. |
|---------------------|-----------------|----------------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| pH | $7,37 \pm 0,05$ | $7,28 \pm 0,05^*$ | $7,19 \pm 0,08^{**}$ | $7,30 \pm 0,05$ | $7,28 \pm 0,05$ |
| pCO_2 (mm Hg) | $37,6 \pm 5,1$ | $45,8 \pm 7,2^*$ | $52,7 \pm 8,7^{**}$ | $42,6 \pm 3,7$ | $40,9 \pm 5,5$ |
| A. Láctico (mmol/l) | $3,00 \pm 1,37$ | $5,04 \pm 2,54^{**}$ | $6,57 \pm 3,85^{**}$ | $4,62 \pm 3,67$ | $3,88 \pm 1,55$ |
| MDA (mmol/l) | $3,28 \pm 0,95$ | $3,28 \pm 1,07$ | $3,20 \pm 0,61$ | $3,52 \pm 1,00$ | $5,49 \pm 0,56^{**}$ |

* $p=0,03$

** $p<0,005$

Tabla I

NADH. Un segundo tipo actúa bajo la forma de oxidasa (forma 0), catalizando la misma conversión, pero utiliza el oxígeno como aceptor de electrones para generar O_2^- y ácido úrico. Es muy escasa en el tejido sano, pero aumenta considerablemente en situación de isquemia (8). La deplección de ATP celular como consecuencia de la falta de oxígeno conlleva una elevación del AMP, que a su vez es catabolizado sucesivamente hasta hipoxantina, substrato de la xantín oxidasa. El aumento de la enzima en su forma 0 (xantón oxidasa) y del substrato (hipoxantina) explicaría la considerable producción de O_2^- en el tejido reperfundido (9) (Fig. 2).

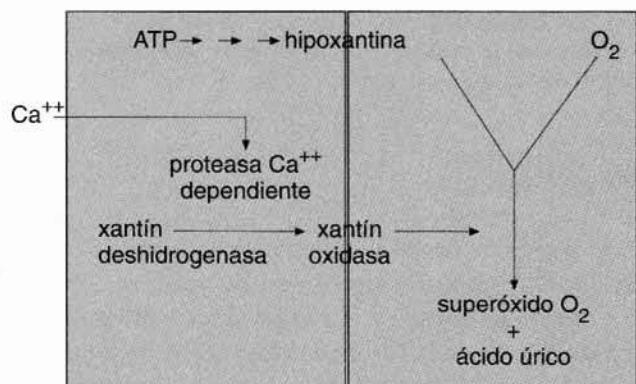


Fig. 2. Generación de anión superóxido (O_2^-), mediado por la xantín oxidasa, tras la reperfusión de tejidos isquémicos.

Existen datos experimentales que confirman el mecanismo de acción de los radicales libres del oxígeno como responsables de la lesión celular a través de procesos de peroxidación lipídica de la membrana, entendiendo por ésta el «deterioro oxidativo» de los ácidos grasos poliinsaturados (ácidos grasos que contienen más de dos dobles enlaces carbono-carbono). El inicio de la peroxidación requiere la «extracción» de un átomo de hidrógeno de uno de los grupos $-CH-$ de la cadena carbonada, dejando un electrón no apareado en el átomo de carbono. Este radical carbono se convierte en una molécula reactiva que se combina rápidamente con el oxígeno para dar radicales peroxy, los cuales a su vez son capaces de combinarse con átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos, iniciando reacciones en cadena que pueden continuar hasta que los ácidos grasos de la

membrana hayan sido completamente oxidados a hidroperóxidos (10).

Se han descrito varios sistemas enzimáticos que se encargan de la destrucción de los metabolitos tóxicos del oxígeno (scavengers), pero la primera línea de defensa está constituida, probablemente, por la superóxido-dismutasa (SOD, scavenger del O_2^-), la catalasa y glutation peroxidasa (scavengers del H_2O_2) y ciertas vitaminas, especialmente la Vit. E y Vit. C (11). Entre las substancias sintéticas, cabe destacar el allopurinol, dimetil-sulfóxido y la N acetil-cisteína. Éstas han sido utilizadas en diversos ensayos para valorar su efecto protector antioxidante y, de forma indirecta, implicar a los oxiradicales en la isquemia de intestino, cerebro, piel, riñón e incluso miocardio. Su papel en el músculo esquelético resulta más incierto, probablemente relacionado con una falta de substrato o enzima suficiente para su producción, explicando en cierto modo la relativa resistencia del músculo a la isquemia. No obstante, Korthius y cols. (12) encontraron un aumento de la permeabilidad y resistencia vascular del músculo esquelético, después de 4 horas de isquemia, que podía ser disminuido significativamente con allopurinol, SOD y dimetilsulfóxido. Walker y cols. (13) consiguieron reducir significativamente la necrosis muscular, en un preparado de músculo gracilis canino aislado, tras su reperfusión con altas concentraciones de SOD, catalasa y manitol tras 5 horas de isquemia. Más recientemente, Kawasaki y cols. (14) han demostrado un incremento significativo de los niveles tisulares de XO y lipoperóxidos tras la reperfusión del músculo isquémico que puede ser prevenido mediante la perfusión previa de SOD.

Los oxiradicales son extraordinariamente inestables y de una vida media muy corta, del orden de milisegundos. Si bien es posible su detección directa mediante espectroscopia de resonancia de spin electrónico (ESR) (15), por lo general se intenta identificar su actividad a través de los metabolitos de degradación generados durante la lipoperoxidación, principalmente conjugados dieno (16) y MDA (17) en material biológico, y alcanos (pentano y etano) en gas espirado (18, 19). El método más utilizado en estudios clínicos, por su sencillez, es la determinación de niveles de MDA, producto intermedio de la peroxidación lipídica que presenta la propiedad de formar complejos coloreados con el ácido tiobarbitú-

rico susceptibles de ser cuantificados mediante determinaciones espectrofotométricas (17).

En este estudio se registró un incremento moderado de los niveles promedio de MDA en sangre periférica (vena cava inferior) a los 60 minutos del desclampaje aórtico. A pesar de la variabilidad de los niveles basales entre los distintos pacientes, el diseño del estudio basado en determinaciones seriadas resulta de importancia crítica en este sentido, ya que cada paciente actúa como control de sí mismo. Por otra parte, es necesario bloquear inmediatamente los fenómenos de peroxidación para garantizar la fiabilidad de las determinaciones. A este respecto, a pesar de que todas las muestras fueron enfriadas con hielo tras la extracción, el tiempo transcurrido hasta su ultracongelación es superior en las primeras determinaciones, por lo que éstas pueden presentar niveles de MDA falsamente elevadas disminuyendo las variaciones obtenidas.

La activación de los fenómenos de peroxidación lipídica, secundario a la generación de radicales libres del oxígeno, ha sido recientemente estudiada en los pacientes sometidos a clampaje aórtico supra-celíaco. Kazui y cols. (19) registraron un aumento significativo del etano en gas espirado entre los 15 y 60 minutos de la reperfusión tras períodos de clampaje superiores a 18 minutos. El análisis de los resultados del presente estudio sugiere que la variación en los parámetros de metabolismo anaerobio tiene una clara relación con el clampaje aórtico, alcanzando su máximo en los primeros minutos tras su liberación para normalizarse con rapidez. Por el contrario, los fenómenos de peroxidación monitorizados a través del MDA se producen de forma tardía en el periodo de reperfusión (fig. 1).

No obstante, es necesario realizar algunas observaciones al modelo. En primer lugar, en dos pacientes el fenómeno de reperfusión afectaba también al parénquima renal (revascularización aorto-ilíaca y renal) y los territorios dependientes del tronco celíaco, arteria mesentérica superior y renales, en otro (aneurisma tóraco-abdominal), por lo que, si bien las muestras fueron extraídas a nivel de la cava inferior infrarrenal, las variaciones registradas en los niveles de MDA no pueden atribuirse exclusivamente a la reperfusión de las extremidades en estos casos. No obstante, tan sólo en el paciente sometido a resección de aneurisma tóraco-abdominal se apreció una ele-

vación significativa en los niveles plasmáticos de MDA tras el desclampaje.

Por otra parte, en tres casos no se detectaron variaciones apreciables en los distintos parámetros, correspondiendo precisamente a aquellos pacientes con clínica isquémica de las extremidades inferiores y ausencia de pulsos distales. El desarrollo previo de circulación colateral podría influir en la mayor tolerancia al clampaje aórtico en estos casos, por lo que creemos necesario incluir esta condición como criterio de exclusión en posteriores ensayos.

La repercusión funcional de los fenómenos de reperfusión depende de diversos factores no completamente aclarados en la actualidad. La hipótesis de que la generación local de radicales libres podría estar relacionada con la aparición de daños tisulares en otros parénquimas y, por tanto, influir en la morbilidad postoperatoria de estos pacientes, es sin duda atractiva (20). En un estudio prospectivo sobre 20 pacientes sometidos a resección de aneurisma de la aorta abdominal, en todos los casos se registró un aumento de la permeabilidad capilar pulmonar, shunt pulmonar y presión inspiratoria máxima asociado a signos radiológicos de edema pulmonar (21). Por otra parte, existe evidencia de que estas manifestaciones pueden ser desencadenadas por los neutrófilos y oxiradicales, ya que tanto la neutropenia como la utilización de «scavengers» parecen ejercer un efecto protector (22, 23). Sin embargo, el punto donde se produce el daño parece ser crítico, ya que el mismo grado de peroxidación lipídica distribuido en un área extensa puede resultar inocuo mientras que su concentración en un área tisular reducida puede desencadenar importantes consecuencias. Además, la fisiopatología de la lesión celular producida por los radicales libres es compleja y puede englobar varios tipos de peroxidación lipídica (13), así como daño a proteínas y DNA. Por tanto, la relación entre el grado de peroxidación lipídica y su efecto clínico parece sujetarse a fenómenos complejos y no es posible extraer conclusiones en este sentido de un reducido grupo de pacientes.

Conclusiones

En base a estos datos, concluimos que existe una activación significativa del metabolismo anaerobio

durante el clampaje aórtico y de la peroxidación tras el desclampaje, si bien éste es un fenómeno independiente y diferido respecto al primero. Asimismo, creemos que éste es un modelo de reperfusión válido para el ensayo, en un futuro próximo, de substancias antioxidantes.

BIBLIOGRAFÍA

- FUCCI, L.; OLIVER, C. N.; COON, M. J.; STADTMAN, E.R. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reaction: possible implication in protein turnover and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983; 80: 1521.
- BLASIG, I.E.; SHUTER, S.; GARLICK, P.; SLATER, T. Relative profiles for free radical trapping, coronary flow, enzyme leakage, arrhythmias, and function during myocardial reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.*, 1994; 16: 35-41.
- WEIXIONG, H.; ANEMAN, A.; NILSSON, U.; LUNDGREN, O. Quantification of tissue damage in the feline small intestine during ischaemia-reperfusion: the importance of free radicals. *Acta Physiol. Scand.*, 1994; 150: 241-50.
- DARR, D.; FRIDOVICH, I. Free radicals in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol.*, 1994; 102: 671-5.
- PARKS, D. A.; BULKLEY, G. B.; GRANGER, D. N. Role of oxygen free radicals in shock, ischaemia, and organ preservation. *Surgery*, 1983; 94: 428-32.
- Breath ethane: a specific indicator of free radical-mediated lipid peroxidation following reperfusion of the ischemic liver. *Free Radical Biol. Med.*, 1992; 13:509-15.
- UCHIYAMA, M. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by the thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, 1978; 86: 271-8.
- MCCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.*, 1985; 312: 159-63.
- MCCORD, J. M. Defense against free radicals has therapeutic implications. *JAMA*, 1984; 251: 2187-92.
- VALLER, R. L.; RECKNEGEL, R. O. Determination of lipid conjugated chenes with tetracyanoethylene 140-significance for study of the pathway of lipid peroxidation. *Lipids*, 1977; 12:914-21.
- REILLY, P. M.; SCHILLER, H. J.; BULKLEY, G. B. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.*, 1991; 161: 488-503.
- KORTHUIS, R. J.; GRANGER, D. N.; TOWNSLEY, M. I.; TAYLOR, A. E. The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increased in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ. Res.*, 1985; 59:609.
- WALKER, P. M.; LINDSAY, T. F.; LABBE, R.; MICKLE, D. A.; ROMASCHIN, A. D. Salvage of ischemic skeletal muscle with free radical scavengers. *J. Vasc. Surg.*, 1987; 5: 68-75.
- KAWASAKI, S.; SUGIYAMA, S.; ISHIGURO, N.; OZAWA T.; MIURA, T. Implications of superoxide radicals on ischemia-reperfusion-induced skeletal muscle in rats. *Eur-Surg. Res.*, 1993; 23: 129-36.
- SAMUNI, A.; CARMICHAEL, A. L.; RUSSO, A.; MITCHEL, J. B.; RIESZ, P. On the spin trapping and ESR detection of oxygen-derived radicals generated inside cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986; 83: 7593-7.
- JACKSON, M. J.; JONES, D. A.; EDWARDS, RHT. Techniques for studying free radical damage in muscular dystrophy. *Medical Biology*, 1984; 62: 135-8.
- LUOTOLA, J. Membrane damage caused by free radicals, radiation perspective. *Medical Biology*, 1984; 62: 115-8.
- RISBY, T. H.; MALEY, W.; SCOTT, R. P. W.; BULKLEY, G. B.; KAZUI, M., et al. Evidence for free radical-mediated lipid peroxidation at reperfusion of human orthotopic liver transplants. *Surgery*, 1994; 115: 94-101.
- KAZUI, M.; ANDREONI, K. E.; WILLIAMS, G. M.; PERLER, B. A.; BULKLEY, G. B.; et al. Visceral lipid peroxidation at reperfusion after supraceliac aortic cross-clamping. *J. Vasc. Surg.*, 1994; 19: 473-7.
- CRINNION, J. N.; HOMER-VANNIASINKAM, S.; GOUGH, M.J. Skeletal muscle reperfusion injury: pathophysiology and clinical considerations. *Cardiovasc. Surg.*, 1993; 1:317-24.
- PATERSON, I. S.; KLAUSNER, J. M.; PUGATCH. et al. Non-cardiogenic pulmonary oedema after abdominal aortic surgery. *Ann. Surg.*, 1989; 209: 231-6.
- KLAUSNER, J. M.; ANNER, H.; PATERSON, I. S.; et al. Lower torso ischemia-induced lung injury is leucocyte dependent. *Ann. Surg.*, 1988; 208: 761-7.
- KLAUSNER J. M.; PATERSON, I. S.; KOBZIK, L.; et al. Oxygen free radicals mediated ischemia induced lung injury. *Surgery*, 1989; 105: 192-9.