

Relación del óxido nítrico con el síndrome de isquemia/reperfusión en el pinzamiento aórtico

C. López-Espada ^a, J.P. Linares-Palomino ^a, G. Escames ^b,
D. Acuña-Castroviejo ^b, E. Ros-Díe ^a

THE RELATIONSHIP BETWEEN NITRIC OXIDE AND ISCHEMIA-REPERFUSION SYNDROME IN AORTIC CLAMPING

Summary. Introduction. Aortic clamping (AC) gives rise to an ischemia-reperfusion syndrome (IRS), with consequences affecting a number of organs, which is currently linked to the damage caused by free radicals and proinflammatory substances. The oxidative stress (OS) produced damages cell membranes and the endothelium, and the synthesis of nitric oxide (NO) may also be involved. Aims. 1. To measure the levels of lipoperoxidation (LPO) in the membranes: an OS indicator. 2. To evaluate the influence of AC on levels of NO in plasma. 3. To establish the relation between NO and LPO. 4. To evaluate the relation between the distribution of NO/LPO and the rates of morbidity and mortality in aortic surgery. Patients and methods. The study included 21 patients with an aortoiliac occlusive pathology and 17 aneurysms, who were submitted to elective AC. 10 blood samples were obtained for biochemical analysis (NO/LPO). The post-operative systemic complications of each patient were noted. The data were analysed according to which group they belonged to. Results. AC produced an increase in LPO and levels of NO in both groups. When OS is excessive (LPO), NO levels drop as it reacts with the free radicals. A greater number of post-operative complications occur in patients who have higher levels of LPO and reduced NO. Conclusions. OS secondary to AC gives rise to an alteration in NO physiology. Reperfusion stimulates the synthesis of NO, which in extreme cases plays a part in increasing oxidative damage. There is a relationship between LPO and NO levels and the rates of morbidity and mortality associated to this intervention. [ANGIOLOGÍA 2005; 57: 19-36]

Key words. Aortic clamping. Free radicals. Ischemia-reperfusion syndrome. Lipoperoxidation. Nitric oxide. Oxidative stress.

Introducción

El pinzamiento aórtico (PA) es una maniobra quirúrgica que somete los tejidos distales a un tiempo variable de isquemia, seguido de una fase de reperfusión.

La isquemia modifica el metabolismo aerobio normal de las células y lo convierte en anaerobio. El resultado es la acumulación de potenciales metaboli-

tos para la producción de hipoxantina y de radicales libres. Cuando se produce la reperfusión entra sangre oxigenada y se reinicia el metabolismo aerobio. La entrada de oxígeno en estas circunstancias especiales desencadena la producción de radicales libres, que normalmente la célula es capaz de controlar con sus propios mecanismos antioxidantes. Si esta producción es desorbita-

^aServicio de Angiología y Cirugía Vascular. ^bDepartamento de Fisiología. Universidad de Granada. Hospital Clínico Universitario San Cecilio. Granada, España.

Correspondencia:

Dra. Cristina López Espada. Canadá, 11. E-18198 Huétor-Vega (Granada). E-mail: cle@valnet.es

© 2005, ANGIOLOGÍA

da, la capacidad antioxidante de las células se sobrepasa –estrés oxidativo (EO)– y se produce la lipoperoxidación de las membranas (LPO) y la célula endotelial, entre otras, se daña seriamente. Este daño estimula la síntesis endotelial de citocinas proinflamatorias como la IL-1 o el TNF- α , que, a su vez, tienen capacidad quimiotáctica y activadora de los neutrófilos. La degranulación de los neutrófilos atraídos a la zona dañada provoca más radicales libres, más daño tisular, y así se perpetúa el círculo vicioso [1-4].

Algunos de estos factores de origen endotelial no sólo desempeñan un importante papel como moduladores del tono vascular, sino también en las interacciones que existen entre las células endoteliales y otras células como los leucocitos o las plaquetas, como ocurre con el óxido nítrico (NO). La deficiente o excesiva producción de varios de estos factores endoteliales en respuesta a la isquemia/reperfusión, provoca la conocida ‘disfunción endotelial’ [5].

La excesiva producción de citocinas y radicales libres en este síndrome, puede hacer que pasen a la circulación general y tener efectos sistémicos [6]. Esas citocinas y los neutrófilos activados pueden acceder a otros órganos diana y desencadenar el fallo multiorgánico (FMO), que aparece en determinados casos y que puede ser mortal sin un correcto tratamiento.

El objetivo de nuestro trabajo es estudiar la relación entre el EO secundario al PA y la disfunción endotelial. La LPO de las membranas celulares es un indicador indirecto fiable del EO. El NO es

una molécula fundamental para el correcto funcionamiento del endotelio.

La interacción entre ambos factores puede desempeñar un papel esencial en la aparición de complicaciones postoperatorias a esta cirugía. Conocer con detenimiento este síndrome de isquemia/reperfusión (SIR) es imprescindible para conseguir reducir la morbimortalidad de esta importante maniobra quirúrgica y aplicar correctas medidas terapéuticas en un futuro.

Pacientes y métodos

Para la realización de este estudio se obtuvo la autorización del Comité Ético del centro hospitalario y el consentimiento informado de cada uno de los pacientes que participaron en él.

Se diseñó un estudio de observación y descriptivo de una muestra de 38 pacientes (calculado *a priori*) que iban a someterse a un PA electivo, en el Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

Selección de los pacientes

Los pacientes se seleccionaron de entre todos los posibles candidatos a cirugía aórtica por dos indicaciones: aneurismas de aorta infrarrenal y patología oclusiva aortoiliaca.

Se diseñaron dos grupos de pacientes: 17 pacientes aneurismáticos (grupo aneurisma) sin patología isquémica asociada y 21 pacientes con lesiones oclusivoestenóticas graves de su sector aortoiliaco (grupo oclusivo). De ambos grupos se recogió una serie de datos

Tabla I. Tipos de complicaciones postoperatorias que contribuyen a la obtención del índice o grado de complejidad postoperatoria.

	Puntuación
Sin signos radiológicos de edema pulmonar	0
RX de tórax con manchas 'algodonosas'	1
Rx de tórax con 'alas de mariposa'	2
Rx de tórax en 'pulmón blanco'	3
Transfusiones intraoperatorias	1
Transfusiones postoperatorias	1
Arritmias en unidad de cuidados intensivos	1
Complicaciones respiratorias	1
Complicaciones cardiológicas	1
Complicaciones intestinales	1
Complicaciones renales	1
Total	10

Tabla II. Porcentajes de cada uno de los grados de complejidad postoperatoria (GCP) en ambos grupos.

GCP	Aneurismas	Oclusivos	Total
0	1 (5,9%)	0	1 (2,6%)
1	1 (5,9%)	3 (14,3%)	4 (10,5%)
2	4 (23,5%)	7 (33,3%)	11 (28,9%)
3	2 (11,8%)	4 (19,0%)	6 (15,8%)
4	3 (17,6%)	6 (28,65%)	9 (23,7%)
5	2 (11,8%)	0	2 (5,3%)
6	1 (5,95%)	0	1 (2,6%)
7	3 (17,6%)	1 (4,8%)	4 (10,5%)

torias. En todos ellos se llevó a cabo la sustitución de la aorta infrarrenal por un injerto protésico, que precisó de un PA de duración variable para cada paciente.

El tiempo de pinzamiento de cada uno de los 38 pacientes de la muestra oscila entre los 45 y los 200 minutos, con una media total de 80,26 minutos.

Datos clínicos

De cada uno de los 38 pacientes del estudio se recogieron una serie de complicaciones postoperatorias del tipo: fallecimiento, necesidad de transfusiones intraoperatorias, transfusiones postoperatorias, arritmias, complicaciones cardiológicas, complicaciones intestinales, renales y grado de distrés respiratorio no cardiogénico valorado en función de una escala radiológica tomada de Miniati et al [7].

Todas estas complicaciones se agruparon en un índice o grado de complejidad postoperatoria (GCP) por paciente, que era el resultado de la suma de cada una de las complicaciones desarrolladas en diferentes órganos de un mismo paciente (Tabla I). Este GCP podía oscilar entre 0 (ninguna complicación) y 7 (suma de varias de ellas). Para reducir la variabilidad de 0 a 7, se agrupó el GCP en dos intervalos:

- Pacientes leves con $GCP \leq 4$ puntos: 31 pacientes de ambos grupos.
- Pacientes graves con $GCP > 4$ puntos: siete pacientes de ambos grupos (Tabla II).

Obtención de las muestras para el estudio

De cada uno de los pacientes incluidos en ambos grupos se obtuvieron diez

epidemiológicos, tales como edad, sexo, factores de riesgo, etc., y datos clínicos de sus complicaciones postopera-

muestras de sangre distribuidas en el tiempo a lo largo de la duración de la intervención. El número de muestras recogidas y el momento de su extracción se fundamenta en diversas publicaciones previas que estudian el SIR en el PA [8-10].

Se procuró que el despinzamiento aórtico (DA) y, por lo tanto, la reperfusión de los tejidos distales al pinzamiento, fuera simultánea para ambos miembros inferiores (MMII), siempre que la situación y el control hemodinámico del paciente lo permitiera.

La imagen gráfica de la distribución de las extracciones de muestras se representa en la figura 1. Las muestras 1 y 2 son basales. Las muestras 3, 4, 5, 6 se extraen durante el pinzamiento y las 7, 8, 9, 10, durante el despinzamiento.

Métodos analíticos

Determinación de la peroxidación lipídica

La medida del grado de LPO de las membranas constituye un parámetro muy importante, con indicador indirecto del EO de determinados eventos, como el SIR.

El índice de peroxidación lipídica se proporcionó por la cuantificación del malonildialdehído y 4-hidroxiacetonas (MDA y 4-HA) presentes en la muestra, los cuales son importantes productos de descomposición de los peróxidos derivados de los ácidos grasos poliinsaturados y sus ésteres relacionados [11]. Se utiliza el kit Bioxytech LPO-568 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) que contiene el reactivo cromógeno NMTF para la reacción.

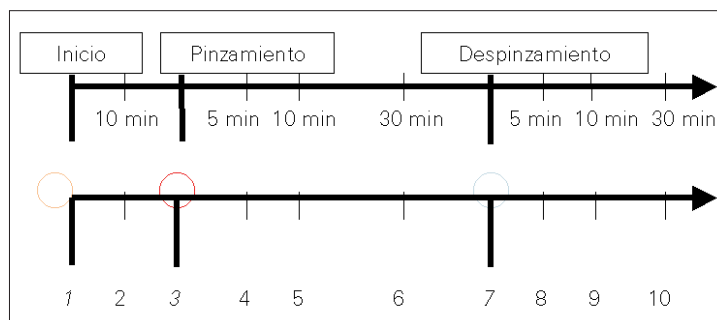


Figura 1. Representación gráfica de la distribución de la obtención de las muestras de sangre a lo largo de la intervención de cada uno de los pacientes.

Determinación de los niveles plasmáticos de nitritos

En humanos, el NO se produce endógenamente desde varias fuentes. Pero, la más importante es la L-arginina, que se oxida por la enzima NO-sintasa para producir: citrulina y NO. La vida media del NO es de 5 segundos o menos.

Las publicaciones más recientes basan sus determinaciones en la reacción de Griess, un reactivo formado por naftil-etilendiamina (NEDA) y sulfanilamida, que se combina con los nitritos para formar un compuesto 'azo' coloreado. La intensidad del color púrpura producida será proporcional a la cantidad de cromógeno formado y, por tanto, a la cantidad de nitritos existentes. Midiendo la absorbancia a 550 nm, se cuantifica esa intensidad [12,13].

Análisis estadístico

Para comparar la evolución de los dos grupos a los diferentes tiempos, se llevó a cabo un análisis estadístico del diseño factorial anidado que tenía como primer factor el grupo (oclusivos/aneurisma), como segundo factor el tiempo

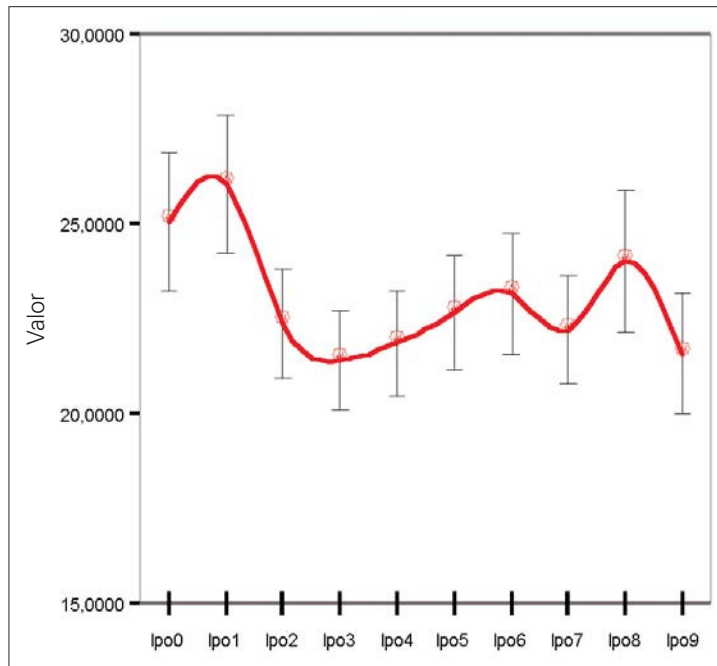


Figura 2. Distribución de los niveles de LPO a lo largo de la intervención, en el conjunto de todos los pacientes.

—los distintos instantes en los que se produjo la medida— y, por último, el paciente que estaba anidado en el grupo y que tenía diferente tamaño de muestra en un grupo y en otro, 21 oclusivos y 17 aneurismas.

Cuando se emplearon medidas de resumen para caracterizar la evolución de los grupos o medidas individuales para comparar entre ambos se empleó el test de comparación de medias para muestras independientes con el empleo la *t* de Student, si las varianzas eran iguales, y el test de Welch, si las varianzas eran distintas.

Cuando el carácter a comparar entre ambos grupos fue cualitativo, se empleó el test exacto de Fisher. Las correlaciones entre variables se hicieron, en el ca-

so de que fueran medidas individuales, con el empleo del coeficiente de correlación de Pearson con su contraste de hipótesis, para ver que era significativamente distinto de cero. Los paquetes estadísticos empleados en el análisis fueron el SPSS 11.1 y STATA 7.0.

Resultados

Las variables resultado de nuestro estudio son los niveles de LPO y los niveles plasmáticos de NO. Estos resultados se pueden dar según lo siguiente:

- Toda la muestra, con los 38 pacientes incluidos en nuestro estudio.
- Resultados en función del grupo: aneurismas y oclusivos.
- Resultados en función del GCP.

Niveles de lipoperoxidación

Lipoperoxidación para toda la muestra

Primero se han analizado las determinaciones de los niveles de LPO para los 38 pacientes incluidos en este estudio. Para ello, se han calculado las medias de las 10 determinaciones en los 38 pacientes.

La representación gráfica de las medias de estas medidas de LPO en los 38 pacientes se muestra en la figura 2.

Lipoperoxidación en cada grupo

Dado que nuestra muestra de pacientes se compone de dos grupos de indicaciones quirúrgicas bien diferenciadas, se analizaron los niveles de LPO a lo largo de la intervención de los 21 pacientes oclusivos y los niveles de LPO a lo largo de la intervención de los 17 pacientes con aneurismas de aorta abdominal.

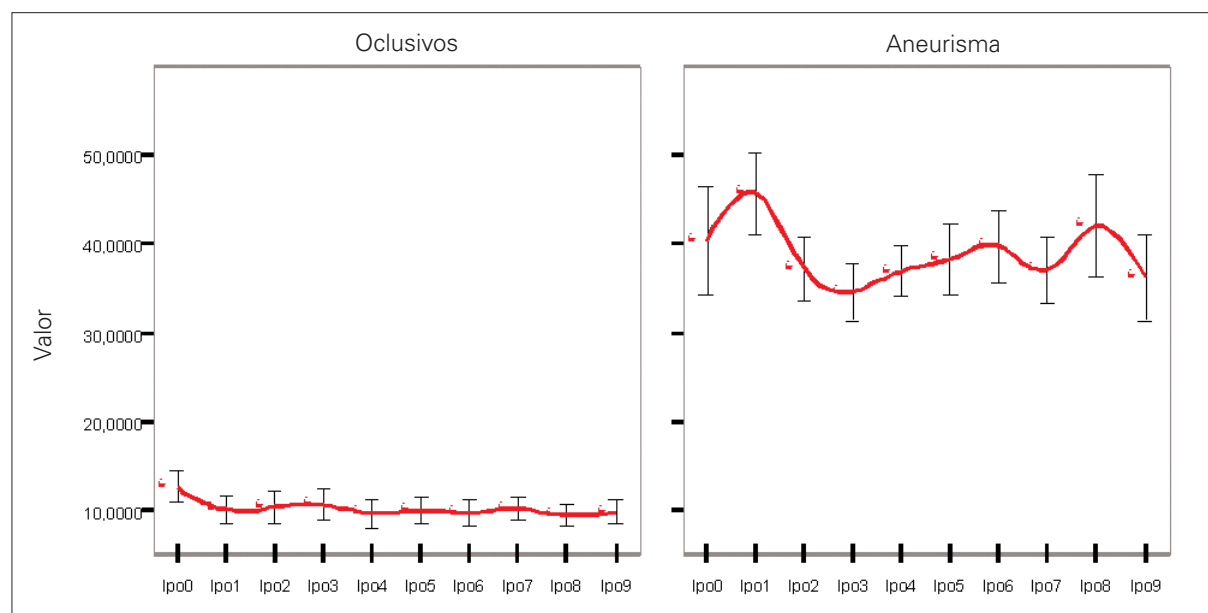


Figura 3. Distribución de los niveles de LPO a lo largo de la intervención, en los dos grupos de pacientes por separado ($p < 0,001$).

Los niveles plasmáticos de LPO en los pacientes del grupo de los aneurismas son superiores a los niveles plasmáticos de LPO de los pacientes oclusivos. Y estas diferencias son estadísticamente significativas en cada uno de los puntos a lo largo de la intervención, al aplicar una t de Student para medias de muestras independientes ($p < 0,001$).

La representación gráfica de estos resultados para cada grupo es la que se muestra en la figura 3.

Lipoperoxidación según las variables clínicas

Nuestra muestra de pacientes se compone de 38 enfermos sometidos a cirugía aórtica electiva, que en el postoperatorio sufrieron algunas complicaciones. Mediante la aplicación de un test de la t de Student para muestras independientes, se demuestra que existen diferencias es-

tadísticamente significativas entre las medias de los niveles de LPO a lo largo de la intervención en los pacientes leves y en los pacientes graves.

La representación gráfica de estos resultados se muestra en la figura 4.

Niveles de óxido nítrico

Niveles de NO para toda la muestra

En nuestro caso se han realizado dichas determinaciones para el conjunto de los 38 pacientes incluidos en el estudio, a lo largo de su intervención y en 10 momentos diferentes.

La representación gráfica de la distribución de los niveles plasmáticos de nitritos muestra la influencia del PA/DA en los niveles de NO para una muestra de 38 pacientes sometidos a cirugía aórtica electiva. Como se puede observar en la figura 5, las concentraciones plasmáticas de NO aumentan progresivamente a lar-

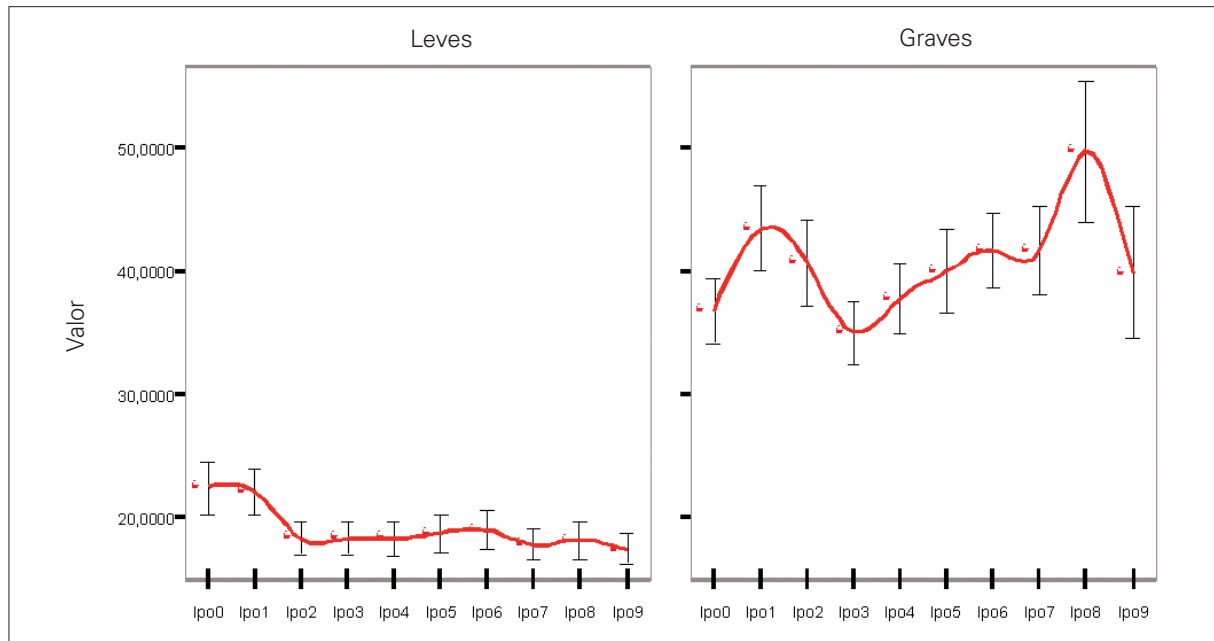


Figura 4. Distribución de los niveles de LPO a lo largo de la intervención, en los dos subgrupos de pacientes ($p < 0,001$).

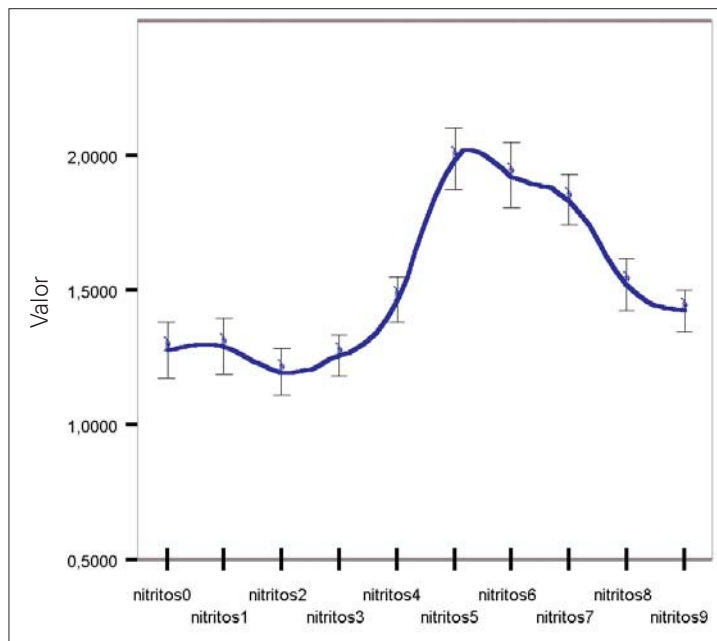


Figura 5. Distribución de los niveles de NO a lo largo de la intervención, en el conjunto de todos los pacientes.

go de la intervención, para luego ligeramente descender en los 38 pacientes.

Niveles de NO en cada grupo

El pinzamiento comienza en la muestra número 3 para ambos grupos y avanza en el tiempo hasta el despinzamiento, que ocurre en la muestra número 7. Podemos hallar el incremento de los niveles de estas determinaciones desde la muestra 3, tomada como referencia y estabilización del paciente. Y observar entonces cómo incrementan o disminuyen las concentraciones de NO a medida que avanza el pinzamiento/despinzamiento y a medida que progresa la intervención.

Mediante un test de la t de Student para la comparación de medias de muestras independientes, se demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los incrementos de con-

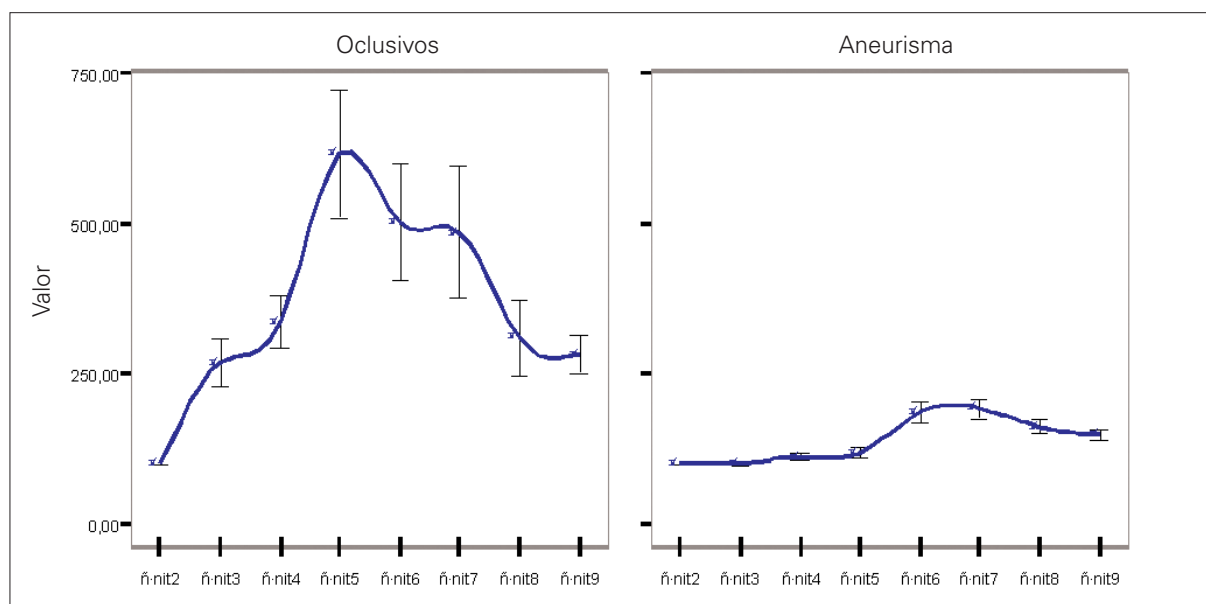


Figura 6. Representación gráfica con las medias de los porcentajes de incremento de las determinaciones de NO con respecto a la muestra A.3/O.3, en ambos grupos.

centración que sufren los pacientes oclusivos a lo largo de su intervención y los incrementos de concentración a lo largo de la intervención de los pacientes con patología aneurismática.

Los porcentajes de incremento de concentración en los pacientes del grupo de los oclusivos son mayores que los porcentajes de incremento en los pacientes aneurismáticos, y estas diferencias son estadísticamente significativas (Fig. 6).

Niveles de NO según las variables clínicas

Los pacientes con mayor número de complicaciones postoperatorias considerados como 'graves', tienen niveles de NO inferiores a los del subgrupo de pacientes considerados como 'leves'. Es decir, a mayor número de complicaciones postoperatorias, menores niveles

plasmáticos de NO. Los pacientes 'leves' mantenían niveles elevados de NO, tras la isquemia/reperfusión del PA.

La comparación de las diferencias encontradas entre las medias de los niveles de NO de ambos subgrupos, no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, la representación gráfica de los porcentajes de incremento de los niveles de NO desde la muestra A.3/O.3 en ambos subgrupos según el GCP, es muy explicativa (Fig. 7).

Relación entre ambas variables

Las correlaciones entre variables LPO y NO se hicieron, en el caso de que fueran medidas individuales, con el empleo del coeficiente de correlación de Pearson con su contraste de hipótesis, para observar que era significativamente distinto de 0; en el caso de las correlaciones de las variables cuya evolución a lo lar-

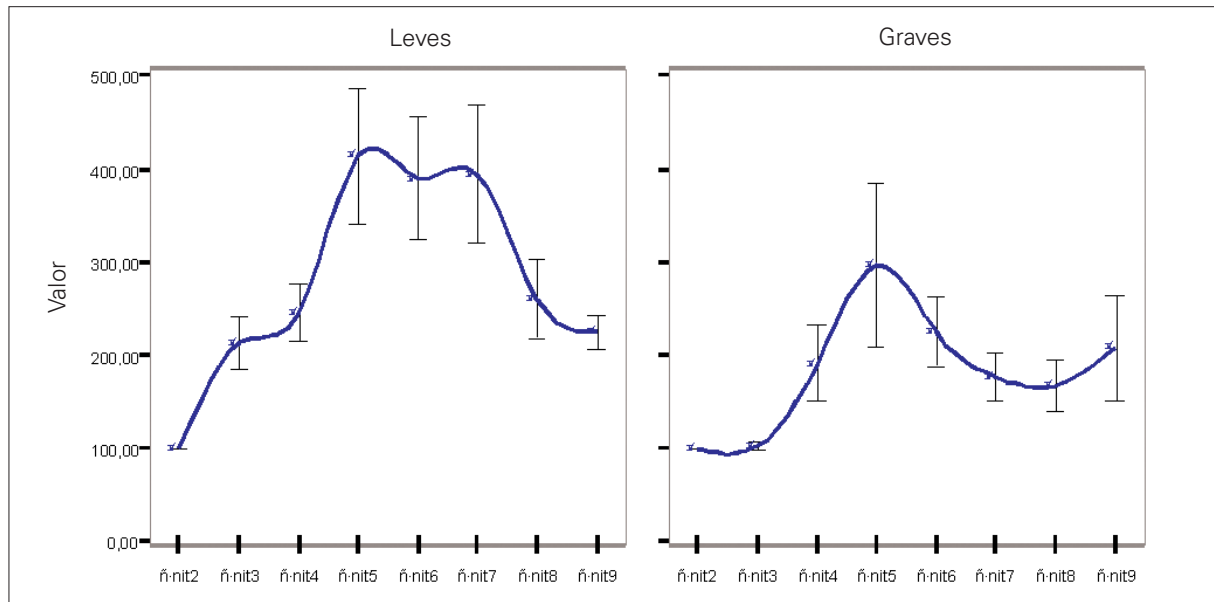


Figura 7. Representación gráfica de los porcentajes de incremento de los niveles de NO desde la muestra A.3/O.3 y a lo largo de la intervención, en función de los dos subgrupos de pacientes según el GCP.

go del tiempo se estudió, se empleó –debido a su estructura de dependencia adicional entre las observaciones debida al instante de tiempo en el que se midieron– el coeficiente de correlación que se obtenía a partir del modelo GEE que caracterizaba tal evolución.

No se encontró correlación entre la distribución de los niveles de LPO y de NO debido a la variabilidad de las determinaciones ($r = -0,1239$, $p = 0,50$). Sin embargo, se intuye cierta correlación, de tal modo que cuando aumentan los niveles de LPO, aumentan los niveles de NO, salvo en aquellas circunstancias de mayor complejidad clínica (aneurismas, pacientes graves y con disfunción pulmonar), en los que los niveles de NO descienden al transformarse en peroxinitrito, otro potente radical libre que contribuye a aumentar el EO y, por tanto, el daño al organismo.

Discusión

A lo largo de las últimas décadas se ha conseguido reducir espectacularmente la mortalidad asociada a la cirugía aórtica. Las mejoras en los materiales de sutura, en las prótesis vasculares y en el tratamiento anestésico han dado lugar a que la mortalidad actual sea inferior al 5% en cirugía electiva [14]. En los últimos años ha sido difícil reducir estas cifras de mortalidad por debajo de este nivel. Actualmente, se plantea mejorar la mortalidad de estas intervenciones controlando el mayor número de complicaciones postoperatorias de diferentes órganos y, con ello, evitar el fracaso multiorgánico y la muerte del paciente.

El objetivo de nuestro estudio ha sido describir la posible relación entre el EO que provoca el PA y las complicaciones

postoperatorias, e intentar, a su vez, descubrir el papel que pudiera desempeñar el NO en este contexto. Para ello, se diseñó un estudio de observación descriptivo, con el que medir el problema (EO/isquemia-reperusión), y buscar diferencias entre dos patologías aórticas diferentes (aneurismas/oclusivos) y en relación con las complicaciones postoperatorias de los pacientes (graves/leves).

El SIR en relación con el PA se ha estudiado ampliamente en la literatura. Por ello, la novedad de nuestro trabajo radica en que conseguimos establecer una relación entre las complicaciones posquirúrgicas del paciente, las modificaciones en los niveles plasmáticos del NO y el EO provocado por el pinzamiento. La interpretación de estos resultados no se había publicado hasta el momento.

Para conseguir demostrar esta hipótesis, se plantearon cuatro objetivos:

Medir el estrés oxidativo en relación con el pinzamiento aórtico

El EO es un término que hace referencia a una situación de excesiva producción de radicales libres en relación con las defensas antioxidantes del organismo. La medida de los niveles de LPO en sangre es un indicador indirecto del daño provocado a las membranas celulares por dicho EO, tanto de una maniobra como es el PA/DA, como de cualquier otro fenómeno de isquemia/reperusión que provoque una explosión de radicales libres.

En nuestro caso, y como muestra la figura 2, apenas si se producen grandes elevaciones de los niveles de LPO, salvo dos pequeños aumentos al inicio y al final de las 38 intervenciones. Estos re-

sultados coinciden con los publicados en la literatura, con un número similar de pacientes y sometidos a la misma maniobra [8-10]. Como razonan Smeets et al [15], la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en curvas similares a ésta, puede deberse a que el PA en una cirugía electiva con tiempos cortos de pinzamiento, y no causa suficiente isquemia distal como para producir una gran cantidad de radicales libres que se puedan reflejar en los niveles de LPO o en otros marcadores de EO.

Por tanto, el PA electivo causa un EO limitado y controlado. Este hecho se demuestra mediante curvas de LPO, como la nuestra y la de otras series.

Otro aspecto diferente es si comparamos los niveles de LPO en los dos grupos de patología aórtica que componen nuestro estudio. En este caso, los resultados son novedosos, ya que la mayor parte de los estudios publicados hasta el momento [6,16] incluyen pacientes sin diferenciar si la patología aórtica de base es aneurismática u oclusiva, y es fácil intuir que la respuesta a una maniobra de PA no puede ser igual en un paciente con un AAA o con un síndrome de Leriche. Como se observa en la figura 3, los niveles de LPO en los pacientes aneurismáticos son superiores a los niveles de LPO de los oclusivos durante toda la intervención, y esta diferencia fue estadísticamente significativa en cada uno de los 10 puntos en los que se realizaron las determinaciones. El máximo de concentración alcanzado en el grupo aneurismas fue de 49,846 nmol/mL, frente al máximo de concentración del grupo oclusivo, que fue de 12,012 nmol/mL.

Esta diferencia en los máximos es estadísticamente significativa con una $p < 0,001$. Por lo tanto, el EO al que se someten los pacientes aneurismáticos durante su cirugía es superior al de los pacientes oclusivos, aunque luego, al formar un conjunto de pacientes, se compensen los resultados de un grupo con los del otro y el resultado se controle más, como se observa en la figura 2.

Valorar la influencia de la cirugía aórtica en los niveles plasmáticos de óxido nítrico

El interés suscitado en nuestro trabajo por el NO radica en sus cuatro propiedades fundamentales: su capacidad vasodilatadora, su actividad antiagregante/antiadhesión plaquetaria, inhibidora de la adhesión leucocitaria y disminución de la proliferación y migración de las células musculares lisas [5]. La pérdida de cualquiera de estas propiedades puede tener consecuencias importantes para todo el organismo, como la hipertensión arterial, la trombosis o el desarrollo de la arteriosclerosis, entre otras [17]. Se han realizado múltiples estudios de las modificaciones en la producción de NO y sus propiedades, en fenómenos como el IAM y la isquemia cerebrovascular. En el campo de la patología aórtica y del SIR del pinzamiento, las publicaciones son más escasas. Analizados con detenimiento, se pueden encontrar resultados contradictorios en cuanto al papel del NO en dicha maniobra. Algunos autores defienden que la capacidad vasodilatadora y antiagregante del NO puede proteger a la microcirculación de los efectos nocivos de la isquemia/reperfusión

[18-20]. Sin embargo, el NO también es una fuente importante de radicales libres y de citotoxicidad que pueden causar más daño tisular [21-23].

En nuestro estudio, la figura 5 es el reflejo de las modificaciones que sufren los niveles de NO de nuestros 38 pacientes a lo largo de la intervención. Como se puede observar, los niveles de NO sufren un ascenso progresivo a lo largo de la fase de isquemia, coincidiendo las máximas concentraciones con el inicio de la fase de reperfusión o despinzamiento y se sigue de un descenso, a medida que avanza el tiempo transcurrido de reperfusión.

De hecho, la media de la concentración de nitritos alcanzada en la fase de isquemia (muestras 3, 4, 5 y 6) es de $1,305 \pm 0,152$ nmol/mL, frente a $1,760 \pm 0,173$ nmol/mL de la fase de reperfusión (muestras 7, 8, 9 y 10); ello demuestra el ascenso en la concentración desde la isquemia a la reperfusión. La comparación de estas dos medias demuestra que la diferencia encontrada es estadísticamente significativa, con una $p < 0,002$.

Estos resultados coinciden parcialmente con los publicados en la literatura [24], aunque los modelos utilizados no son idénticos; en general, se puede deducir de ellos que los fenómenos de isquemia/reperfusión de MMII, provocan un aumento en la producción de NO, como en nuestro estudio.

La producción de NO por el organismo y en condiciones normales es constante y a baja concentración. Sin embargo, en condiciones de isquemia se produce una disminución de aporte del O_2 a los tejidos necesario para continuar sinteti-

zando NO. Esto provoca un ligero descenso en la producción de NO en las fases más iniciales. En cuanto comienza la reperfusión, se origina la entrada de una excesiva cantidad de Ca^{2+} dentro de las células endoteliales y esto induce una corta excitación de la enzima eNOS- Ca^{2+} -dependiente. Después de un breve período (minutos), las células endoteliales se encuentran disfuncionantes y la producción de NO por la eNOS disminuye (óxido nítrico-sintasa-endotelial). Entonces es cuando los mediadores de la inflamación activados por el endotelio ($\text{TNF-}\alpha$, citocinas, etc.) activan a la iNOS (óxido-nítrico-sintasa-inducible) y se produce una mayor concentración de NO y durante un tiempo más prolongado.

Según todo lo anterior, es muy importante analizar si este aumento del NO en respuesta al PA/DA se comporta por igual en los dos grupos de patología aortoiliaca que compone nuestra muestra de pacientes. No existe ninguna publicación en la literatura que diferencie de una manera explícita la respuesta del NO en estos dos grupos y asociado a una maniobra de PA. En la figura 6 se observan las diferencias observadas en las medias de los porcentajes de ambos grupos. Estas diferencias son estadísticamente significativas en cada uno de los puntos, con una $p < 0,05$. Podemos afirmar que los oclusivos siguen el mismo patrón que la curva general: el PA provoca un aumento en sus concentraciones plasmáticas. Es decir, en el grupo de oclusivos se produce un aumento en la producción de NO en respuesta al SIR del PA. Sin embargo, parece que la respuesta de los pacientes con patología aneurismática no es igual,

ya que también se produce un ascenso en la producción de NO, pero mucho menor que el ascenso en los pacientes del grupo oclusivo.

Relacionar ambas variables (LPO/NO)

La respuesta de ambos grupos al fenómeno de isquemia/reperfusión del PA es idéntica: producir más NO. Sin embargo, hay un factor influyente y simultáneo que diferencia ambos grupos. Mientras que en el grupo de oclusivos las consecuencias sistémicas del PA son menores, en el grupo de los aneurismas se produce un mayor EO –un mayor aumento de LPO–, en comparación con el otro grupo (Fig. 3).

En el SIR del grupo aneurismático se produce una mayor elevación de radicales libres, simultáneamente a la elevación del NO. El aumento concomitante y progresivo en la producción de radicales como el O_2^- hace que reaccionen rápidamente con el NO para producir el OONO^- . De esta manera, la elevación en la concentración de NO en los pacientes aneurismáticos no se detectaría, porque rápidamente descendería para transformarse en radicales peroxinitrito, que contribuyen a un mayor EO [25,26]. Así lo demuestran Huk et al [27], pero en un modelo de isquemia/reperfusión en ratones: a medida que las concentraciones de O_2^- aumentan, paralelamente disminuyen las concentraciones de NO, y este efecto es más evidente en el momento en el que se produce la reperfusión y las concentraciones de O_2^- son máximas y el NO desciende drásticamente.

La reacción del NO con el O_2^- para

formar OONO^- es más rápida ($k = 3,8 \times 10^9 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) que la reacción del O_2^- con SOD (superoxidodismutasa) para formar peróxido y O_2 ($k = 2 \times 10^9 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Esto sugiere que la SOD puede prevenir la reacción no enzimática del NO con el O_2^- , mientras las concentraciones de NO se mantengan relativamente estables [28]. De esta manera, durante la isquemia y, sobre todo, durante los primeros minutos de la reperfusión, la liberación de NO no depende sólo de la disponibilidad de O_2 y de L-arginina (precursor de NO), sino también de la concentración de O_2^- acumulado.

En el caso de los pacientes oclusivos, el EO secundario al PA/DA es menor. Al ser inferior la cantidad de radicales libres producidos, el NO puede permanecer elevado durante más tiempo en respuesta a la isquemia/reperfusión que se haya producido. Mientras que el NO es un potente vasodilatador, el OONO^- es un débil vasodilatador y el O_2^- es un vasoconstrictor, por lo que la vasodilatación disminuirá durante el curso de estos fenómenos de isquemia/reperfusión [29]. El NO tiene propiedades vasodilatadoras y antiagregantes que pueden beneficiar la microcirculación durante estos fenómenos de I/R. No obstante, el NO también es una fuente importante de ONOO^- que pueden causar más daño [30]. Las cantidades picomolares de NO producidas por la eNOS no son tóxicas y tienen propiedades antiinflamatorias y vasodilatadoras de gran utilidad en este contexto. Sin embargo, las altas concentraciones de NO generadas por la iNOS son proinflamatorias y aumentan el daño a los tejidos distales al contribuir al incremento del EO [31].

Podríamos resumir que la respuesta del NO a un fenómeno determinado de isquemia/reperfusión es aumentar su concentración, gracias a una corta estimulación de la eNOS y a una mantenida producción de iNOS. Y esto es lo que ocurre en la mayoría de los pacientes oclusivos de nuestra muestra. En estos casos, la cantidad de NO excede a la producción de radical superóxido y esto permite que el NO mantenga su capacidad vasodilatadora, antiagregante y antineurotrófica. Sin embargo, en determinados eventos con una excesiva producción de radicales libres por la reperfusión, como ocurre en el grupo de aneurismas: la balanza entre el NO y el radical superóxido se inclina a favor del superóxido y se produce un descenso en la concentración de NO que se transforma por el O_2^- en ONOO^- . De esta manera, se reduce la biodisponibilidad del NO y se afecta la capacidad vasodilatadora de esta molécula. De estas modificaciones en la producción basal de NO pueden surgir varias de las complicaciones postoperatorias que sufren estos pacientes [32].

Valorar la relación de LPO y NO con las complicaciones clínicas de los pacientes

El PA y la reperfusión inician una cascada de respuestas inflamatorias sistémicas que dañan al endotelio y aumenta la permeabilidad vascular. La aparición de una excesiva cantidad de radicales libres, superior a la capacidad defensiva normal del organismo, provoca la acumulación de los mismos y los daños a estructuras celulares, que no van a poder protegerse. Los efectos de estos radica-

les libres pueden ser focales o afectar a órganos a distancia, como el pulmón o los riñones [33]. La disfunción de estos y otros órganos simultáneamente puede llevar al paciente a una situación de FMO, principal causa de muerte en la cirugía aórtica [34].

En nuestra muestra fueron 31 los pacientes clasificados como leves y siete los graves. Es interesante comprobar como en los pacientes de mayor índice de GCP o 'graves', los niveles de LPO alcanzados a lo largo de la intervención son bastante más elevados que la LPO de los pacientes 'leves'. Las medias de LPO en los dos subgrupos son muy diferentes (Fig. 4) y esta diferencia fue estadísticamente significativa en cada uno de los puntos de ambos grupos ($p < 0,001$). El máximo de concentración alcanzado por el grupo de 'graves' fue de $55,720 \pm 11,702$ nmol/mL, frente a $22,890 \pm 3,561$ nmol/mL del grupo de 'leves', con una $p < 0,046$.

Por otro lado, el análisis de los niveles de NO en este subgrupo de pacientes confirma las teorías expuestas hasta este momento. Según nuestros resultados, los pacientes en peor estado general considerados como 'graves', tenían niveles de NO inferiores a los del subgrupo contrario (Fig. 7). Es decir, los pacientes con mayor número de complicaciones postoperatorias tenían niveles plasmáticos de NO menores. Los pacientes 'leves' mantenían niveles elevados de NO tras la isquemia/reperfusión del PA. En la misma línea que resultados anteriores, los niveles plasmáticos de NO en los pacientes del subgrupo 'graves', se influyen por los niveles de LPO o de EO. Los

altos niveles de radicales libres tras la reperfusión influyen en los niveles plasmáticos de NO. A medida que las concentraciones de O_2^- aumentan, paralelamente descenden las concentraciones de NO y, por eso, los niveles de NO de este subgrupo serían inferiores al de pacientes 'leves' [35]. Con estos resultados volvemos a confirmar que la determinación de los niveles plasmáticos de LPO y de NO pueden ser indicadores de la gravedad de las consecuencias de la reperfusión. En pacientes con mayor disfunción multiorgánica, los niveles de LPO son muy altos y el NO descende.

Algunas otras publicaciones de carácter experimental sugieren esta interacción y la relación con la mortalidad. En un estudio en ratas de Jin et al [36], se confirma que el efluente venoso procedente de MMII isquémicos tiene capacidad para inhibir la producción de NO y simultáneamente aumentar la mortalidad. En su estudio, la mayor mortalidad se relaciona con los niveles más bajos de NO. En este mismo modelo [37], la administración de L-arginina como precursor del NO consigue disminuir la mortalidad asociada al PA/DA.

En conclusión, el PA provoca un fenómeno de isquemia/reperfusión de consecuencias locales y sistémicas. Cuando se produce la reperfusión, es decir, el despinzamiento, se sobrepasa la capacidad antioxidante de las células, se produce la LPO de las membranas y la célula endotelial se daña seriamente. Este daño estimula la síntesis endotelial de citocinas proinflamatorias como la IL-1 o el TNF- α , que, a su vez, tienen capaci-

dad quimiotáctica y activadora de los neutrófilos. La degranulación de los neutrófilos atraídos a la zona dañada provoca más daño tisular, y así se perpetúa el círculo vicioso.

El daño a las membranas se refleja con la medida de los niveles de LPO de las mismas, que, por tanto, es un indicador indirecto del EO al que se ha sometido un paciente por el PA. Junto con el aumento de los niveles de LPO, nuestro estudio también ha detectado un aumento en los niveles de NO en respuesta a la isquemia/reperfusión del PA. Solamente existe una salvedad, y ocurre en aquellos subgrupos en los que los niveles de EO alcanzados por la isquemia/reperfusión son los más altos. En los pacientes con patología aneurismática, el excesivo aumento en la producción de radicales libres como el O_2^- hace que reaccionen rápidamente con el NO para producir el $ONOO^-$. De esta manera, la elevación en la concentración de NO en los pacientes con mayor EO no se detectaría, porque rápidamente descendería para transformarse en radicales peroxinitrito que contribuyen a un mayor daño celular. Por lo

tanto, existen diferencias evidentes entre la respuesta al pinzamiento de los pacientes con patología oclusiva y los pacientes aneurismáticos, que este estudio ha puesto claramente de manifiesto. En los pacientes aneurismáticos, los efectos de la isquemia/ reperfusión son peores y esto se refleja en los niveles de LPO y de NO.

Según nuestros resultados, podríamos considerar la medida de los niveles de LPO y de NO como un indicador de gravedad, ya que existe una correlación clara entre: mayores niveles de LPO, menores niveles de NO y mayor gravedad clínica. El número de órganos vitales que se afectan y la gravedad de su afectación dependerá en gran medida del nivel de EO al que se someta todo el organismo tras la maniobra de PA. Cuanto mayor sea el daño isquémico, el grado de reperfusión y, por lo tanto, el EO producido durante esta maniobra, mayor será el número de órganos afectados, la gravedad del daño y las posibles consecuencias mortales para el paciente. En nuestro caso, los niveles de LPO y de NO son un indicador fiable del daño celular producido por el PA.

Bibliografía

1. Lindsay T, Luo X, Lehotay D, Rubin B, Anderson M, Walker P, et al. Ruptured abdominal aortic aneurysm, a 'two-hit' ischemia/reperfusion injury: evidence from an analysis of oxidative products. *J Vasc Surg* 1999; 30: 219-28.
2. Swartbol P, Truedsson L, Norgren L. The inflammatory response and its consequence for the clinical outcome following aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001; 21: 393-400.
3. Bown MJ, Nicholson ML, Bell R, Sayers R. Cytokines and inflammatory pathways in the pathogenesis of multiple organ failure following abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001; 22: 485-95.
4. Holmberg A, Bergqvist D, Westman B, Siegbahn A. Cytokine and fibrinogen response in patients undergoing open abdominal aortic aneurysm surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999; 17: 294-300.
5. Makhoul R, Fields CH, Cassano A. Nitric oxide and the vascular surgeon. *J Vasc Surg* 1999; 30: 569-72.
6. Ward A, McBurney A, Lunec J. Evidence for the involvement of oxygen-derived free radi-

- cals in ischaemia-reperfusion injury. *Free Rad Res* 1994; 20: 21-8.
7. Miniati M, Pistoletti M, Paoletti P, Giuntini C, Lebowitz MD, Taylor AE, et al. Objective radiographic criteria to differentiate cardiac, renal and injury lung edema. *Invest Radiol* 1988; 23: 433-40.
8. Khaira HS, Maxwell SRJ, Thomason H, Thorpe GHG, Green MA, Shearman CP. Antioxidant depletion during aortic aneurysm repair. *Br J Surg* 1996; 83: 401-3.
9. Kretzschmar M, Klein U, Palutke M, Schirrmeyer W. Reduction of ischemia-reperfusion syndrome after abdominal aortic aneurysmectomy by N-acetylcysteine but not mannitol. *Acta Anaesthesiol Scand* 1996; 40: 657-64.
10. Wijnen MH, Roumen RM, Vader HL, Goris RJ. A multioxidant supplementation reduces damage from ischaemia reperfusion in patients after lower torso ischaemia. A Randomised trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 23: 486-90.
11. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-21.
12. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 892-6.
13. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol* 1996; 268: 142-51.
14. Hertzner NR, Mascha EJ, Karafa MT, O'Hara PJ, Krajewski LP, Beven EG. Open infrarenal abdominal aortic aneurysm repair: the Cleveland Clinic experience from 1989 to 1998. *J Vasc Surg* 2002; 35: 1145-54.
15. Smeets HJ, Camps J, van Milligen de Wit AW, Kievit J, van Bockel JH, Hermans J, et al. Influence of low dose allopurinol on ischaemia-reperfusion injury during abdominal aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995; 9: 162-9.
16. Cornu-Labat G, Serra M, Smith A, McGregor WE, Kasirajan K, Hirko MK, et al. Systemic consequences of oxidative stress following aortic surgery correlate with the degree of antioxidant defenses. *Ann Vasc Surg* 2000; 14: 31-6.
17. Vural KM, Bayazit M. Nitric oxide: implications for vascular and endovascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001; 22: 285-93.
18. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how and why? *J Clin Invest* 1997; 100: 2146-52.
19. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, et al. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for atherosclerosis. *J Clin Invest* 1995; 95: 1747-55.
20. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, et al. Flow-induced vasodilation in human forearm is dependent on endothelium-derived nitric oxide. *Am J Physiol* 1996; 270: 1432-40.
21. Brown GC. Nitric oxide inhibition of cytochrome oxidase and mitochondrial respiration: implications for inflammatory, neurodegenerative and ischaemic pathologies. *Mol Cell Biochem* 1997; 174: 189-92.
22. Sandau K, Pfeilschifter J, Brüne B. The balance between nitric oxide and superoxide determines apoptotic and necrotic death of rat mesangial cells. *J Immunol* 1997; 158: 4938-46.
23. Szabolcs MJ, Ravalli S, Minanov O, Sciacca RR, Michler RE, Cannon PJ. Apoptosis and increased expression of inducible nitric oxide synthase in human allograft rejection. *Transplantation* 1998; 65: 804-12.
24. Pararajasingam R, Weight SC, Bell PR, Nicholson ML, Sayers RD. Pulmonary nitric oxide metabolism following infrarenal aortic cross-clamp-induced ischemia-reperfusion injury. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; 19: 47-51.
25. Zhang ZG, Chopp M, Bailey F, Malinski T. Nitric-oxide changes in the rat-brain after transient middle cerebral-artery occlusion. *J Neurol Sci* 1995; 128: 22-7.
26. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 743-51.
27. Huk I, Nanobashvili J, Neumayer C, Punz A, Mueller M, Afkhampour K, et al. L-arginine treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Circulation* 1997; 96: 667-75.
28. Kobayashi K, Miki M. A direct demonstration of reaction of nitric oxide with superoxide anion by the use of pulse radiolysis. In Asada K, Yoshikawa T, eds. *Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994. p. 223-4.
29. Oredsson S, Plate G, Qvarfordt P. Experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury in skeletal muscle. *Eur J Surg* 1994; 23: 229-35.
30. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman

- BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch Biochem Biophys 1991; 288: 481-7.
31. Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. Br J Surg 1997; 84: 920-35.
32. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. J Pathol 2000; 190: 255-66.
33. Rajimakers PG, Groeneveld AB, Rauwerda JA, Teule GJ, Hack CEl. Acute lung injury after aortic surgery: the relation between lung and leg microvascular permeability to 111indium-labelled transferrin and circulating mediators. Thorax 1997; 52: 866-71.
34. Sayers RD, Thompson MM, Nasim A, Healey P, Taub N, Bell PR. Surgical management of 671 abdominal aortic aneurysms: A 13 years review from a single centre. Eur J Vasc Endovasc Surg 1997; 13: 322-7.
35. RD Sayers. Aortic aneurysms, inflammatory pathways and nitric oxide. Ann R Coll Surg Engl 2002; 84: 239-46.
36. Jin JS, Webb RC, D'Alecy LG. Inhibition of vascular nitric-oxide-cGMP pathway by plasma from ischemic hindlimb of rats. Am J Physiol 1995; 269: 254-61.
37. Jin JS, D'Alecy LG. Stimulation of endogenous nitric oxide pathway by L-arginine reduces declamp mortality and attenuates hypertension associated with aortic cross-clamp-induced hindlimb ischemia in rats. Hypertension 1995; 26: 406-12.

**RELACIÓN DEL ÓXIDO
NÍTRICO CON EL SÍNDROME
DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN
EN EL PINZAMIENTO AÓRTICO**

Resumen. Introducción. El pinzamiento aórtico (PA) provoca un síndrome de isquemia/reperfusión (SIR) de consecuencias multiorgánicas, que actualmente se relaciona con el daño provocado por radicales libres y sustancias proinflamatorias. El estrés oxidativo (EO) producido daña las membranas celulares y al endotelio, y se puede afectar la síntesis de óxido nítrico (NO). Objetivos. 1. Medir los niveles de lipoperoxidación (LPO) de las membranas: indicador del EO. 2. Valorar la influencia del PA en los niveles plasmáticos de NO. 3. Relacionar los niveles de NO con la LPO. 4. Valorar la relación entre la distribución de NO/LPO y la morbimortalidad de la cirugía aórtica. Pacientes y métodos. 21 pacientes con patología oclusiva aortoiliaca y 17 aneurismas, sometidos a un PA electivo. Se obtuvieron 10 muestras de sangre para las determinaciones bioquímicas (NO/LPO). Se recogieron las complicaciones sistémicas postoperatorias de cada paciente. Se analizaron los datos en función de la pertenencia a cada grupo. Resultados. El PA produce en ambos grupos un aumento de la LPO y de los niveles de NO. Cuando el EO es excesivo (LPO), descienden los niveles de NO al reaccionar con los radicales libres. La acumula-

**RELAÇÃO DO ÓXIDO
NÍTRICO COM A SÍNDROMA
DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO
NA CLAMPAGEM AÓRTICA**

Resumo. Introdução. A clampagem aórtica (CA) provoca uma síndrome de isquemia/reperfusão (SIR) de consequências multiorgânicas, que actualmente se relaciona com a lesão provocada por radicais livres e substâncias pró-inflamatórias. O stress oxidativo (SO) produzido lesiona as membranas celulares e o endotélio, e pode afectar a síntese do óxido nítrico (NO). Objectivos. 1. Medir os níveis de lipoperoxidação (LPO) das membranas: indicador do EO. 2. Avaliar a influência da CA nos níveis plasmáticos de NO. 3. Relacionar os níveis de NO com a LPO. 4. Avaliar a relação entre a distribuição de NO/LPO e a morbimortalidade da cirurgia aórtica. Doentes e métodos. 21 doentes com patologia oclusiva aorto-ílica e 17 aneurismas, submetidos a CA electiva. Obtiveram-se 10 amostras de sangue para as determinações bioquímicas (NO/LPO). Recolheram-se as complicações sistémicas pós-operatórias de cada doente. Analisaram-se os dados em função da pertinência a cada grupo. Resultados. A CA produz em ambos os grupos um aumento da LPO e dos níveis de NO. Quando o SO é excessivo (LPO), os níveis de NO descem ao reagir com os radicais livres. A acumulação de

ción de mayor número de complicaciones postoperatorias se produce en aquellos pacientes con mayores niveles de LPO y descenso de NO. Conclusiones. El EO secundario al PA provoca una alteración en la fisiología del NO. La reperfusión estimula la síntesis de NO, que en casos extremos contribuye a aumentar el daño oxidativo. Existe una relación clara entre los niveles de LPO, de NO y la morbilidad asociada a esta cirugía. [ANGIOLOGÍA 2005; 57: 19-36]

Palabras clave. Estrés oxidativo. Lipoperoxidación. Óxido nítrico. Pinzamiento aórtico. Radicales libres. Síndrome de isquemia/reperfusión.

maior número de complicações pós-operatórias produz-se naqueles doentes com maiores níveis de LPO e descida de NO. Conclusões. O SO secundário à CA provoca uma alteração na fisiologia do NO. A reperfusão estimula a síntese de NO, que em casos extremos contribui para aumentar a lesão oxidativa. Existe uma relação clara entre os níveis de LPO, de NO e a morbimortalidade associada a esta cirurgia. [ANGIOLOGÍA 2005; 57: 19-36]

Palavras chave. Clampagem aórtica. Lipoperoxidação. Óxido nítrico. Radicais livres. Síndrome de isquemia/reperfusão. Stress oxidativo.